

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Pathologische Biochemie  
Bereich Pathologische Biochemie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

*„Einfluss von extramitochondrialen Ca-Ionen auf isolierte  
Rattenlebermitochondrien  
unter Hypoxie und Reoxygenierung“*

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

( doctor medicinae )

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Frank Plumeyer

aus Burg

Magdeburg 2003

## Dokumentationsblatt

### Bibliographische Beschreibung:

*Plumeyer, Frank:*

Einfluss von extramitochondrialen Ca-Ionen auf isolierte Rattenlebermitochondrien unter Hypoxie und Reoxygenierung.  
-2003. = 65 Bl. : 15 Abb.

### Kurzreferat:

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zum Verständnis der Rolle von Mitochondrien bei Ischämie/Reperfusion der Leber zu leisten. Dazu wurden isolierte Rattenlebermitochondrien einer transienten Hypoxie in Gegenwart unterschiedlicher extramitochondrialer Ca-Ionen-Konzentrationen zwischen 0 und 5  $\mu\text{M}$  ausgesetzt und die Aktivität der oxidativen Phosphorylierung und die Oxidation von Proteinen untersucht. Hypoxie/Reoxygenierung verursacht oxidativen Stress und eine funktionelle Schädigung der Lebermitochondrien, die konzentrationsabhängig von Ca-Ionen modifiziert werden. Hohe Ca-Ionen-Konzentrationen verstärken die Schädigung, während im Bereich zwischen 1 und 2  $\mu\text{M}$ , extramitochondriale Ca-Ionen eine protektive Wirkung zeigten. Diese Wirkung ist durch einen verbesserten antioxidativen Schutz bedingt. Die im Rahmen der Arbeit erhobenen Daten lassen den Schluss zu, dass bei Leberischämie/Reperfusion die mitochondriale ATP-Bereitstellung durch oxidativen Stress geschädigt wird und dass eine moderat erhöhte cytosolische Ca-Ionen-Konzentration eine schützende Funktion besitzt.

**Schlüsselwörter:** Mitochondrien, Calcium, Hypoxie/Reoxygenierung, Stickstoffmonoxid, oxidativer Stress

Diese Arbeit widme ich meiner lieben Frau und meinen geliebten Kindern.

## Inhaltsverzeichnis:

|   |    |
|---|----|
| <b>1. Abkürzungsverzeichnis</b> .....   | 6  |
| <b>2. Einführung</b> .....  | 7  |
| <b>3. Methodik</b> .....  | 10 |
| 3.1 Isolation intakter Mitochondrien aus der Leber der Ratte .....  | 11 |
| 3.2 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials .....  | 11 |
| 3.3 Inkubation der Mitochondrien .....  | 11 |
| 3.4 Atmungsmessung .....  | 12 |
| 3.5 NO - Messung während der Hypoxie .....  | 12 |
| 3.6 Einstellen der Ca-Ionen-Konzentrationen .....   | 12 |
| 3.7 Bestimmung proteingebundener Carbonyle mittels Immunoblot .....   | 13 |
| 3.8 Bestimmung der Aktivität der mitochondrialen Mn-Superoxiddismutase .....  | 14 |
| 3.9 Bestimmung der Aktivität der mitochondrialen Glutathionperoxidase .....   | 14 |
| 3.10 Proteinbestimmung .....  | 14 |
| 3.11 Statistik .....  | 14 |
| <b>4. Ergebnisse</b> .....  | 15 |
| 4.1 Einfluss ansteigender Ca-Ionen-Konzentrationen auf die aktive Atmung von frisch isolierten Rattenlebermitochondrien .....   | 16 |
| 4.1.1 Einfluss der Reoxygenierungszeit auf die aktive Atmung in Ca-Ionen-freien Inkubationen .....  | 16 |
| 4.1.2 Einfluss der Reoxygenierungszeit auf die aktive Atmung der Mitochondrien nach Zugabe von 1,8 $\mu\text{M}$ Ca-Ionen .....   | 18 |
| 4.1.3 Einfluss der Reoxygenierungszeit auf die aktive Atmung der Mitochondrien nach Zugabe von 3,6 $\mu\text{M}$ Ca-Ionen .....   | 20 |
| 4.2 Einfluss ansteigender Ca-Ionen-Konzentrationen auf die aktive Atmung und das Membranpotential von frisch isolierten Rattenlebermitochondrien ohne Hypoxie/Reoxygenierung..... | 21 |
| 4.3 Einfluss von extramitochondrialen Ca-Ionen auf die Atmung und das Membranpotential von frisch isolierten Rattenlebermitochondrien unter                                       |    |

|   |    |
|---|----|
| Hypoxie/Reoxygenierung .....  | 23 |
| 4.4 Proteinoxidation bei Hypoxie/Reoxygenierung .....   | 26 |
| 4.5 Wirkung von Cyclosporin A auf die aktive Atmung und das<br>Membranpotential frisch isolierter Rattenlebermitochondrien unter<br>Hypoxie und Reoxygenierungsbedingungen bei unterschiedlichen<br>extramitochondrialen Ca-Ionen-Konzentrationen ..... | 28 |
| 4.6 Aktivität der Mn-Superoxiddismutase .....   | 32 |
| 4.6.1 <i>Abhängigkeit der Aktivität der Mn-Superoxiddismutase (Mn-SOD) von<br/>der extramitochondrialen Ca-Ionen-Konzentration ohne/mit<br/>Hypoxie/Reoxygenierung</i> .....  | 32 |
| 4.6.2 <i>Einfluss von Ca-Ionen auf die Aktivität kommerzieller Mn-<br/>Superoxiddismutase (Standard-SOD)</i> .....  | 34 |
| 4.6.3 <i>Einfluss von Ca-Ionen und Hypoxie/Reoxygenierung auf den Gehalt an<br/>Mn- Superoxiddismutase</i> .....  | 36 |
| 4.7 Aktivität der Glutathionperoxidase unter Hypoxie und Reoxygenierung<br>in Gegenwart von extramitochondrialen Ca-Ionen .....   | 38 |
| 4.8 NO-Konzentration unter hypoxischen Bedingungen .....  | 40 |
| 4.9 Wirkung von NO auf die Atmung der Mitochondrien nach Hypoxie<br>und Reoxygenierung bei zwei unterschiedlichen extramitochondrialen<br>Ca-Ionen-Konzentrationen .....  | 42 |
| 4.10 Zusammenfassung der Ergebnisse .....   | 44 |
| 4.10.1 <i>Modulation der Atmung und der Membranpermeabilität durch Ca-<br/>Ionen und Hypoxie/Reoxygenierung</i> .....   | 44 |
| 4.10.2 <i>Regulierung der antioxidativen Verteidigung durch<br/>extramitochondriale Ca-Ionen bei Hypoxie/Reoxygenierung</i> .....   | 45 |
| <b>5. Diskussion</b> .....  | 47 |
| 5.1 Schädigung von isolierten Rattenlebermitochondrien durch Hypoxie/<br>Reoxygenierung und extramitochondrialen Ca-Ionen .....   | 47 |
| 5.2 Regulation der Mn-Superoxiddismutase und der Glutathionperoxidase<br>durch Ca-Ionen und Hypoxie / Reoxygenierung .....  | 49 |
| <b>6. Schlussfolgerungen</b> .....  | 51 |
| <b>7. Fazit</b> .....   | 53 |
| <b>8. Zusammenfassung</b> .....   | 54 |
| <b>9. Literaturverzeichnis</b> .....  | 57 |
| <b>10. Danksagung</b> .....   | 63 |
| <b>11. Erklärung</b> .....  | 64 |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>12. Beruflicher Werdegang</b> ..... | <b>65</b> |
|--|-----------|

## 1. Abkürzungsverzeichnis:

|                   |   |
|-------------------|---|
| ADP               | Adenosindiphosphat  |
| ATP               | Adenosintriophosphat  |
| 3% C              | Prozent Bis-Acrylamid von der Summe Acrylamid plus Bis-Acrylamid                              |
| EGTA              | ethylene glycol bis( $\beta$ -aminoethylester)-N,N,N',N'-tetraacetic acid                     |
| GPx               | Glutathionperoxidase  |
| Ig G              | Immunglobulin G   |
| L-arg             | L-Arginin   |
| Mn-SOD            | Mangan-Superoxiddismutase   |
| SOD               | Superoxiddismutase  |
| MPTP              | Mitochondrial-Permeability-Transition-Pore  |
| NADP <sup>+</sup> | Nikotinamadenindinucleotidphosphat (oxidierte Form)   |
| NADPH             | Nikotinamadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)  |
| NO                | Stickstoffmonoxid   |
| ROS               | radikale Sauerstoffspezies  |
| SDS               | Sodium-Dodecyl-Sulfat   |
| SH-Gruppen        | Schwefel-Wasserstoff-Gruppen  |
| TPP <sup>+</sup>  | Tetraphenylphosphonium  |
| 10% T             | Prozent der Summe Acrylamid plus Bis-Acrylamid in Bezug auf das Gesamtvolumen (Masse/Volumen) |

## 2. Einführung

Die zeitlich begrenzte Unterbrechung der Blutzufuhr in der menschlichen Leber ist ein häufiger Zustand im Gesamtorganismus, der ein hohes Maß an medizinischem Wissen erfordert. Die therapeutische Strategie besteht darin, durch schnelles Reperfundieren die Ischämiezeit so kurz wie möglich zu halten.

In erster Linie sind als Ursachen der Ischämie traumatische Gründe zu nennen. Bei der Ruptur der Leber ist eine totale Hepatektomie im Sinne der Unverzichtbarkeit auf dieses Organ nicht induziert. Hier besteht die Therapie darin, die Leber oder Leberteile schnellstmöglich wieder in den Blutkreislauf einzubinden.

In der Therapie vieler Lebererkrankungen ist die iatrogene Ischämie mit anschließender Reperfusion ein fester Bestandteil. Viele Eingriffe finden unter partieller Leberischämie statt. Die partielle Ischämie der Leber wird durch das Abklemmen des Ligamentum hepatoduodenale induziert, wonach Teile der Leber entfernt werden können (Lebermetastasen, Echinokokkuszysten).

Es kann aber auch durch eine Embolie in der Arteria hepatica, bei der Pfortaderthrombose oder Cavathrombose ohne traumatischen Einfluss zu einer Ischämie in der Leber kommen. Nicht selten ist trotz schnellen Reperfundierens ein akutes oder chronisches Leberversagen die Folge, welches eine Lebertransplantation erforderlich macht. Mit 560 Lebertransplantationen pro Jahr in der BRD besitzt diese Organtransplantation eine große praktische Relevanz. Hierbei ist ebenfalls die temporäre Ischämie, mit anschließender Reoxygenierung, der erforderliche Ablauf.

Trotz der schnellen Organreperfusion kommt es häufig zu einer Schädigung der Hepatozyten. Durch die Hypoxie/Reoxygenierung werden in Endothelien, Kupferzellen (1) und den Hepatozyten Sauerstoffradikale formiert, die Kalziumhomöostase dysreguliert, Proteasen und Lipasen aktiviert und das Mitochondrienmembranpotential erniedrigt. Diese

Mechanismen sind typische Faktoren, die den programmierten Zelltod nach Hypoxie/Reoxygenierung auslösen können.

Speziell für Lebermitochondrien konnte an Tieren gezeigt werden, dass sowohl die Gesamtzelle, als auch die Mitochondrien durch vorübergehende Ischämie beschädigt werden (2).

Ein besonderes Kennzeichen von Leberischämie-/Reperfusion ist die signifikante Zunahme der zytosolischen und der mitochondrialen Ca-Ionen-Konzentrationen während der Reperfusion (3). Durch oxidativen Stress wird dann das Öffnen der, Mitochondrial-Permeability-Transition-Pore ' (MPTP) wahrscheinlich. Es konnte gezeigt werden, dass das Cyclosporin A, ein bekanntes Immunsuppressivum und ein Inhibitor der MPTP, Lebermitochondrien in der Phase der Reoxygenierung schützt (4, 5). Die Erhöhung der Permeabilität führt zur Freisetzung proapoptischer Faktoren, wie Cytochrom c, vom intermembranösen Raum. Bei dauerhafter Ischämie in der Leber konnte gezeigt werden, dass diese eine Nekrose der Zelle nach sich zog, wohingegen kurzzeitige Hypoxie/Reoxygenierung, die durch Cytochrom c initiierte Apoptose hervorrief (6).

Ein weiterer Faktor, der die Folgen der Hypoxie/Reoxygenierung bestimmt, ist das Stickstoffmonoxid (NO). Die Wirkung von NO auf Mitochondrien und Zellen ist nicht vollständig geklärt. Exogenes NO oder NO-Donatoren haben bei Ischämie/Reperfusion einen protektiven Effekt (7, 8). Es sind aber auch Hinweise der schädigenden Wirkung von NO in *In-vitro*-Modellen mit Rattenlebermitochondrien nach transientser Hypoxie bekannt (9, 10). Extramitochondriales NO reguliert den Elektronentransport durch die Atmungskette durch kompetitive Hemmung der Cytochrom-Oxidase (11). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Mitochondrien selbst mit einer konstitutiven und kalziumsensitiven NO-Synthetase ausgestattet sind, die vielleicht wesentlich für die Regulation der oxidativen Phosphorylierung ist. Untersuchungen an isolierten Rattenlebermitochondrien haben gezeigt, dass weitere extramitochondriale Faktoren die Mitochondrien maßgeblich beeinflussen. Extramitochondriale Ca-Ionen-Konzentrationen im niedrigen mikromolaren Bereich sind an der Schädigung des Komplexes 3 der

Atmungskette beteiligt (12). Sie instabilisieren die mitochondriale Membran, erzwingen das Öffnen der MPTP (13-18) und die Freilassung von Cytochrom c. Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies stellt einen wesentlichen Faktor der Schädigung bei Hypoxie/Reoxygenierungsschäden dar. So verletzen extramitochondriale Sauerstoffradikale durch Oxidation von Lipiden, Proteinen und DNA die mitochondriale Funktion und Integrität (19). Mitochondrien selbst sind bedeutende Produzenten reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Hepatozyten. Diese ROS schädigen Bestandteile der mitochondrialen Elektronen-Transport-Kette (Komplex 3 und 4 der Atmungskette) (20). Auf diese Art tragen die Mitochondrien unter Ischämie/Reperfusion zu ihrer eigenen Verletzung bei.

Die Wirkungsmechanismen einzelner Faktoren auf die Mitochondrien, wie zum Beispiel hohe extramitochondriale Ca-Ionen-Konzentration, Bildung und Einfluss von Stickstoffmonoxid und Sauerstoffradikale während der Ischämie/Reperfusion sind gut bekannt. Ihr Zusammenspiel während der Ischämie/Reperfusion wird jedoch noch schlecht verstanden.

Aus diesem Grund setzten wir isolierte Rattenlebermitochondrien 5 Minuten Hypoxie und anschließend 10 Minuten Reoxygenierung unter dem Einfluss von extramitochondrialen Ca-Ionen bis zu einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  aus.

**Fragestellung:** Die Untersuchungen hatten das Ziel, den Einfluss von Ca-Ionen auf isolierte Mitochondrien in Verbindung mit Hypoxie/Reoxygenierung zu charakterisieren.

(1) Abhängig von der Konzentration besitzen Ca-Ionen einen regulatorischen oder schädigenden Einfluss auf die oxidative Phosphorylierung. Es wurde untersucht, wie Atmung und Membranpotential frisch isolierter Rattenlebermitochondrien von der extramitochondrialen Ca-Ionen-Konzentration abhängen.

(2) Welchen Einfluss nehmen extramitochondriale Ca-Ionen auf die NO-Synthetase während Hypoxie/Reoxygenierung und welche Wirkung hat

das Cycloporin A in diesem Modell auf das mitochondriale Membranpotential.

- (3) Bei Ischämie/Reperfusion steigt die Ca-Ionen-Konzentration im Zytoplasma an. Hier wurde untersucht, welchen Einfluss die extramitochondriale Ca-Ionen-Konzentration auf die Schädigung von isolierten Rattenlebermitochondrien durch Hypoxie/Reoxygenierung hat und ob die Aktivitäten der Mn-Superoxiddismutase und der Glutathionperoxidase von Ca-Ionen und/oder Hypoxie/Reoxygenierung abhängen.

### **3. Methodik**

Hinsichtlich der bearbeiteten Fragestellungen wurden einzelne Bestimmungsmethoden optimiert. Die angewandte Inkubations- und Messanordnung verfügte über die Integration einer Clark-Elektrode, die eine Überwachung der Sauerstoffkonzentration ermöglichte. Zusätzlich wurde in einem Teil der Experimente eine integrierte TPP<sup>+</sup>-sensitive Elektrode zur Membranpotentialmessung benutzt. Auf diese Weise konnte das Erreichen der Hypoxie überwacht werden. Durch N<sub>2</sub> und die Atmung der Mitochondrien wurde eine Beseitigung des Sauerstoffs aus dem Inkubationsvolumen erreicht, wodurch nahezu anoxische Bedingungen erzielt wurden. Diese Methode wurde bei der Durchführung des größten Teils der Experimente angewandt.

Neben analytischen Methoden kam auch das präparative Verfahren zur Isolation von Mitochondrien aus Rattenleber zur Anwendung. Die Methoden sind im nachfolgenden Text detailliert beschrieben.

#### ***3.1 Isolation intakter Mitochondrien aus der Leber der Ratte***

Aus männlichen Wistar-Ratten (220-240g) wurden nach einer modifizierten Standardprozedur (21) isolierte Rattenlebermitochondrien präpariert. Das

eisgekühlte Isolationsmedium enthielt 250 mM Saccharose, 20 mM Tris-HCL (pH 7,4), 2 mM EGTA und 1% Rinderserumalbumin. Die ersten Isolationsschritte bestanden in der Homogenisierung und Zentrifugation bei 3000 U/min für 5 Minuten und 11 000 U/min (SORVALL, Rotor SS24) für 10 Minuten. Danach wurde Percoll (1,4 ml pro 6 ml Suspension) zugesetzt, um eine bessere Abtrennung vom endoplasmatischen Retikulum und vom Golgi-Apparat zu erreichen (22). Anschließend wurde wiederum für 10 Minuten bei 11 000 U/min zentrifugiert. Mit 15 ml Isolationsmedium wurden dann die Pellets gelöst und erneut für 10 Minuten bei 11 000 U/min zentrifugiert. Zum Schluss der Isolation erfolgte die Aufnahme der Pellets mit 1,4 ml Isolationsmedium und anschließender Homogenisierung mit Hilfe eines Handhomogenisators. Mit Succinat als Substrat (plus Rotenon) war der respiratorische Kontrollindex stets größer als 5.

### ***3.2 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials***

Die Verteilung des lipophilen Kations Tetraphenylphosphonium ( $\text{TPP}^+$ ) lieferte die Grundlage zur Messung des Membranpotentials. Dazu wurde die extramitochondriale  $\text{TPP}^+$ -Konzentration mittels einer  $\text{TPP}^+$ -sensitiven Elektrode gemessen. Sie war, wie die Clark-Elektrode, in die Messzelle integriert. Bei der Berechnung des Membranpotentials sind ein Matrixvolumen der Mitochondrien von 1  $\mu\text{l}/\text{mg}$  mitochondrialem Protein vorausgesetzt. Weiterhin wurden bei der Berechnung des Membranpotentials Analysen des Bindungsverhaltens von  $\text{TPP}^+$  mit Bestandteilen des Inkubationsmediums (23) und der Lösung von  $\text{TPP}^+$  in Membranen (24) berücksichtigt.

### ***3.3 Inkubation der Mitochondrien***

Die Inkubation der Lebermitochondrien (1mg/ml) musste in einem Medium erfolgen, welches im Wesentlichen der Elektrolytkomposition im Zytosol entspricht. So enthielt das Medium 10 mM Saccharose, 120 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 15 mM NaCl, 5 mM Kaliumphosphat, 0,5 mM

EGTA und 1 mM freies Magnesium. Außerdem wurde es auf 30 °C gehalten.

Um hypoxische Bedingungen zu erzeugen, wurden 2 ml des Inkubationsmediums, 1  $\mu\text{M}$  TPP<sup>+</sup> und 50% der Gesamt-Ca-Ionen-Menge mit N<sub>2</sub> durchblasen, bis kein Sauerstoff mittels der Clark-Elektrode mehr nachweisbar war. Dann erfolgte die Zugabe der Mitochondriensuspension (1 mg/ml). Die hypoxische Inkubation erfolgte bei geschlossener Messzelle bei allen Versuchsansätzen mit einer Dauer von 5 Minuten. Danach wurde mit 2 ml luftgesättigtem Inkubationsmedium, TPP<sup>+</sup> und 50% der Gesamt-Ca-Ionen-Menge reoxygeniert. Diese Dauer betrug, bis auf die ersten Versuchsreihen, in denen die Reoxygenierungszeiten untersucht wurden, stets 10 Minuten. Anschließend wurden 5 mM Glutamat und 5 mM Malat hinzupipettiert, die Messzelle geschlossen und mit den Aufzeichnungen der Atmung und des Membranpotentials begonnen. Für die Kalibrierung der Elektrode wurde ein Sauerstoffgehalt des luftgesättigten Mediums von 217 nmol O<sub>2</sub>/ml zugrunde gelegt (25). Nach der Registrierung der Leak-Atmung erfolgte die Zusetzung von 200  $\mu\text{M}$  ADP, um die aktive Atmung zu erzeugen. Bis zum vollständigen Verbrauch von ADP vollzog sich die Aufzeichnung. Dann wurden 3 Proben, jeweils 1 ml Volumen, aus der Messzelle entnommen und durch sofortiges Eintauchen in flüssigem Stickstoff gefroren. Sie dienten, bei einer Lagerung von -80 °C, der Bestimmung unterschiedlichster Parameter. Diese Inkubationsmethode erreichte eine außerordentlich niedrige Konzentration von Sauerstoff, welche durch die Atmung der Mitochondrien unter Verbrauch von Sauerstoff erklärt wird. Ein zusätzlicher und funktioneller Beleg für die hypoxischen Bedingungen war das drastische Abfallen des Membranpotentials während der hypoxischen Phase.

### **3.4 Atmungsmessung**

Durch eine in die Messzelle integrierte Clark-Elektrode wurde bei 30 °C der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien gemessen. Nach Zugabe der Substrate Malat und Glutamat wurde mit Hilfe eines Stöpsels die

thermostatierte und gerührte Messzelle verschlossen. Mit einem Schreiber, der an das Messgerät angeschlossen war, erfolgte die Aufzeichnung der Atmung. Schließlich wurde ADP durch einen kleinen Kanal im Stöpsel in die Messzelle injiziert.

### ***3.5 NO - Messung während der Hypoxie***

Die Bestimmung des mitochondrialen Stickstoffmonoxids wurde mit Hilfe einer NO-sensitiven Elektrode realisiert. Die Elektrode war in die Messzelle integriert. Die Aufzeichnung begann schon vor der Hypoxie der Mitochondrien und wurde für die gesamte Zeit der hypoxischen Inkubation durchgeführt. Die NO-Synthetase benötigt für die NO-Synthese Arginin, so dass dieses vor jeder Messung zugesetzt werden musste.

### ***3.6 Einstellen der Ca-Ionen-Konzentrationen***

Die extramitochondrialen Ca-Ionen-Konzentrationen wurden durch Ca-EGTA-Puffer eingestellt und auf der Basis der scheinbaren Stabilitätskonstanten von Ca-EGTA, Mg-EGTA, Ca-ATP, Mg-ATP, Ca-ADP, Mg-ADP, Ca-HPO<sub>4</sub> und Mg-HPO<sub>4</sub>, die aus den entsprechenden absoluten Stabilitätskonstanten berechnet wurden, mittels eines Computerprogramms ermittelt (26).

### ***3.7 Bestimmung proteingebundener Carbonyle mittels Immunoblot***

Zur Bestimmung der proteingebundenen Carbonyle von Proben mittels Immunoblot, wurde eine Derivatisierung mit Dinitrophenylhydrazin und eine Aufarbeitung für eine reduktive SDS/Elektrophorese nach Levin. (27) durchgeführt. Die Proben wurden auf ein 10% T, 3% C Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach den von Schaeffer und von Jago vorgeschlagenen Bedingungen erfolgte die Trennung. Der Blot vollzog sich nach der Methode

von Tovey und Baldo (28). Zur Immunofärbung wurde IgG aus Kaninchen gegen 2,4-Dinitrophenyl-Gruppen in einer Verdünnung von 1:1500 benutzt. Ein Anti-IgG vom Schaf, welches mit Peroxidase konjugiert war, fand als sekundärer Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 seine Verwendung.

### ***3.8 Bestimmung der Aktivität der mitochondrialen Mn-Superoxiddismutase***

Die Bestimmung der Aktivität der mitochondrialen Mn-Superoxidismutase beruhte auf der photometrischen Messung der Reduktion von Cytochrom c bei einer Wellenlänge von 550 nm mit dem Xanthin/Xanthinoxidasesystem nach Flohé und Ötting (29). Dazu wurden 500 µl-Proben aus den Inkubationsansätzen entnommen und unmittelbar danach in flüssigem Stickstoff eingefroren. Vor der Messung wurden die Mitochondrien durch dreimaliges Frieren und Tauen aufgeschlossen.

### ***3.9 Bestimmung der Aktivität der mitochondrialen Glutathionperoxidase***

Die Bestimmung der Aktivität der Glutathionperoxidase beruhte auf einem gekoppelten optischen Test, in dem zunächst Glutathion oxidiert wurde und die Oxidation von NADPH verursachte (30). Als Substrat wurde Hydroperoxid verwendet. Zur Quantifizierung wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 340 nm in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt.

### ***3.10 Proteinbestimmung***

In Abhängigkeit von der Proteinmenge und der Untersuchungsmethode wurde die Biuretmethode (31) oder die Methode nach Bradford (32), jeweils mit Rinderserumalbumin als Standard angewendet.

### **3.11 Statistik**

Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von n Mitochondrienpräparationen präsentiert.

## **4. Ergebnisse**

Ca-Ionen besitzen in den Mitochondrien mehrere Funktionen, die zum größten Teil konzentrationsabhängig sind. So verfügen Mitochondrien über ein Transportsystem für Ca-Ionen, welches die Aufnahme sowie den Efflux von Ca-Ionen ermöglicht. Mit diesem Transportsystem gelingt es den Mitochondrien, Änderungen der Ca-Ionen-Konzentrationen im Zytoplasma der Zelle in die mitochondriale Matrix zu übertragen. Im submikromolaren Konzentrationsbereich besitzen Ca-Ionen eine regulatorische Funktion für den mitochondrialen Energiestoffwechsel. Steigen die Konzentrationen in den mikromolaren Bereich an, so fungieren die Mitochondrien als Ca-Ionen-Puffer. Es werden dann große Mengen von Ca-Ionen mit Phosphat-Ionen komplexiert. Der Gipfel der Ca-Ionen-Konzentrationen ist schließlich dann erreicht, wenn es zum Öffnen einer unspezifischen Pore der Innenmembran ( Mitochondrial- Permeability-Transition-Pore; MPTP ) kommt. Die oxidative Phosphorylierung kommt dann vollständig zum Erliegen.

In der hypoxischen, wie auch in der posthypoxischen Phase, steigen die Ca-Ionen-Konzentrationen im Zytoplasma dramatisch an. Somit ist ein spezifischer Einfluss von extramitochondrialen Ca-Ionen auf die Schädigung der Mitochondrien sehr wahrscheinlich.

Ziel der Experimente war es, den Einfluss von Ca-Ionen auf frisch isolierte Rattenlebermitochondrien in Verbindung mit Hypoxie und Reoxygenierung zu charakterisieren. Hinsichtlich dieser Aufgabenstellung wurde untersucht,

wie Atmung und Membranpotential von den extramitochondrialen Ca-Ionen-Konzentrationen abhängen. Im Hinblick auf den dramatischen Anstieg von Ca-Ionen in der hypoxischen und posthypoxischen Phase wurde zudem der Einfluss von Ca-Ionen auf die Reaktionen der Schutzenzyme in den Mitochondrien auf die Schädigung durch Hypoxie und Reoxygenierung untersucht.

Um eine Ca-Ionen-freie Suspension an Rattenlebermitochondrien zu erreichen, wurde ein Isolationsmedium eingesetzt, welches 2 mM EGTA enthielt. Durch die Komplexbildung wurden verschleppte extramitochondriale Ca-Ionen gebunden.

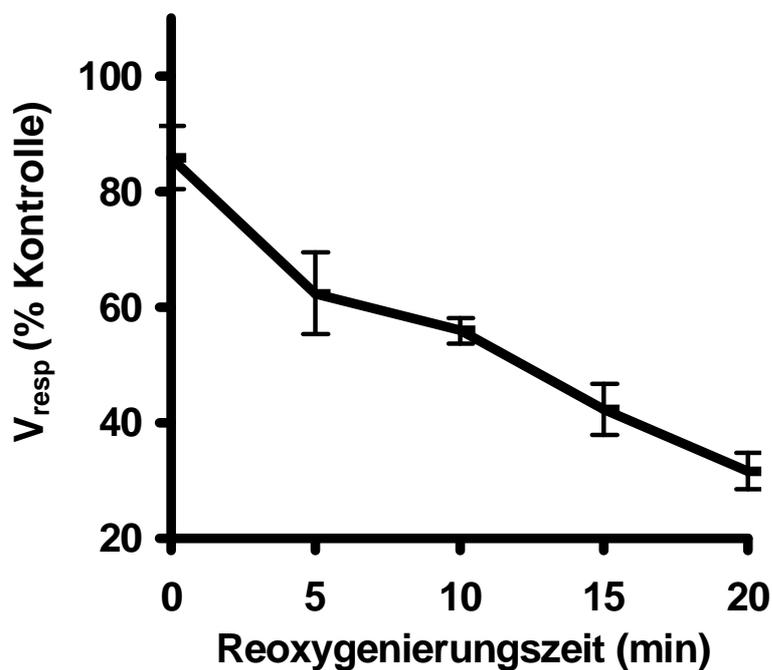
Im Rahmen der Aufgabenstellung wurden darüber hinaus weitere Einflussgrößen untersucht. Nach jeder Inkubation unter Hypoxie und Reoxygenierung wurden Proben entnommen, die der Bestimmung verschiedener Parameter dienten. Die Dauer der Hypoxie blieb während der Versuche konstant und betrug stets 5 Minuten. Aus anderen Untersuchungen ist bekannt (33), dass es nach dieser Zeit zu einer Schädigung der Mitochondrien gekommen ist. Nach einer Reoxygenierung wurde die aktive Atmung ( nach ADP-Zugabe ) bestimmt.

Das Ausmaß der Schädigung zeigt sich in einer Verringerung der aktiven Atmung. Bei einer Hypoxiedauer von über 10 Minuten ist damit zu rechnen, dass die Mitochondrien zur oxidativen Phosphorylierung nicht mehr fähig sind. Die Hypoxiedauer von 5 Minuten allein verursacht eine mittlere und auswertbare Schädigung.

#### ***4.1 Einfluss ansteigender Ca-Ionen-Konzentrationen auf die aktive Atmung von frisch isolierten Rattenlebermitochondrien***

#### 4.1.1 Einfluss der Reoxygenierungszeit auf die aktive Atmung in Calcium-freien Inkubationen

Zur Untersuchung des Einflusses der Reoxygenierungszeit auf die aktive Atmung, wurden Rattenlebermitochondrien einer Hypoxiedauer von 5 Minuten ausgesetzt.



**Abbildung 1: Einfluss der Reoxygenierungszeit auf die aktive Atmung.** Rattenlebermitochondrien wurden bei 30°C substratfrei für 5 Minuten einer Hypoxie im Inkubationsmedium ausgesetzt. Die Bestimmung der aktiven Atmungsgeschwindigkeit ( $V_{\text{resp}}$ ) erfolgte zu den entsprechenden Zeitpunkten nach Reoxygenierung und Zugabe von 5 mM Glutamat, 5 mM Malat und 200  $\mu\text{M}$  ADP. Die Daten sind als relative Größen, bezogen auf die aktive Atmung einer normoxischen Kontrollinkubation, präsentiert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von 4 Mitochondrienpräparationen.

Die hypoxischen Bedingungen wurden mittels Durchblasung des Inkubationsmediums mit  $N_2$  erreicht. Die anschließenden Reoxygenierungen beliefen sich jeweils auf eine Dauer von 5, 10, 15 und 20 Minuten. Der respiratorische Kontrollindex der verwendeten Mitochondrien war stets höher als 5. Die Atmungsgeschwindigkeiten der Mitochondrien ohne Hypoxie ohne Reoxygenierung wurden als 100% gesetzt. Daran wurden die Atmungsgeschwindigkeiten nach einer Reoxygenierung von 5, 10, 15 und 20 Minuten gemessen und als Prozentangabe dargestellt.

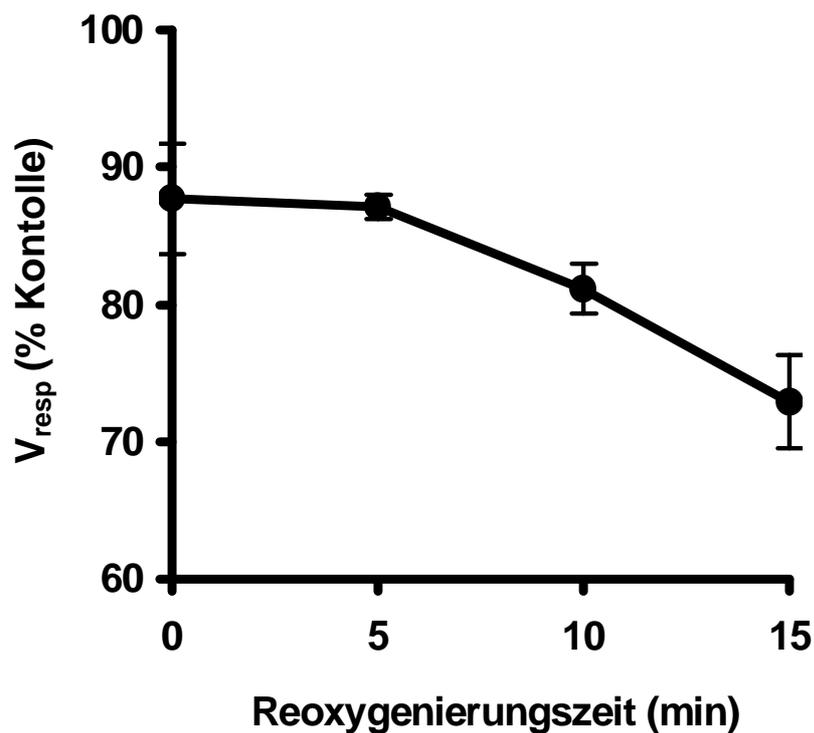
Die Abbildung 1 zeigt, dass die aktive Atmung mit steigender Reoxygenierungszeit abnahm. Nach 5 Minuten Hypoxie und anschließender 15-minütiger Reoxygenierung sank die Atmungsgeschwindigkeit im Vergleich zur Hypoxie ohne Reoxygenierung um zirka 50%.

#### **4.1.2 Einfluss der Reoxygenierungszeit auf die aktive Atmung der Mitochondrien nach Zugabe von 1,8 $\mu$ M Ca-Ionen**

Zur Untersuchung des Einflusses einer moderat erhöhten extramitochondrialen Ca-Ionen-Konzentration auf die aktive Atmung erfolgte die Zugabe von 1,8  $\mu$ M Ca-Ionen. Die Konzentration betrug im hypoxischen Inkubationsmedium 1,8  $\mu$ M Ca-Ionen, das zur Reoxygenierung eingesetzte Inkubationsmedium ebenfalls 1,8  $\mu$ M Ca-Ionen. Somit war eine Gesamtkonzentration von 1,8  $\mu$ M Ca-Ionen sichergestellt. Auch hier wurde die aktive Atmung der normoxischen Kontrolle als 100% gewertet. Der Einfluss der Reoxygenierungszeit mit 1,8  $\mu$ M Ca-Ionen auf die Atmungsgeschwindigkeit ist in der Abbildung 2 dargestellt.

Die Atmungsgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Reoxygenierungszeiten mit Ca-Ionen differierten deutlich von denen ohne Ca-Ionen. Bei einer Hypoxiedauer von 5 Minuten und einer Reoxygenierungszeit von 5 Minuten belief sich die Atmungsgeschwindigkeit etwa auf die Geschwindigkeit ohne Reoxygenierung. Im Vergleich dazu betrug sie ohne

Ca-Ionen bei 5-minütiger Reoxygenierung etwa 73,5%. Der Einfluss von 1,8  $\mu\text{M}$  Ca-Ionen wird auch am relativ langsamen Abfall der Atmungsgeschwindigkeiten deutlich. Sie betrug bei 15 Minuten Reoxygenierung immerhin noch 80,8%.

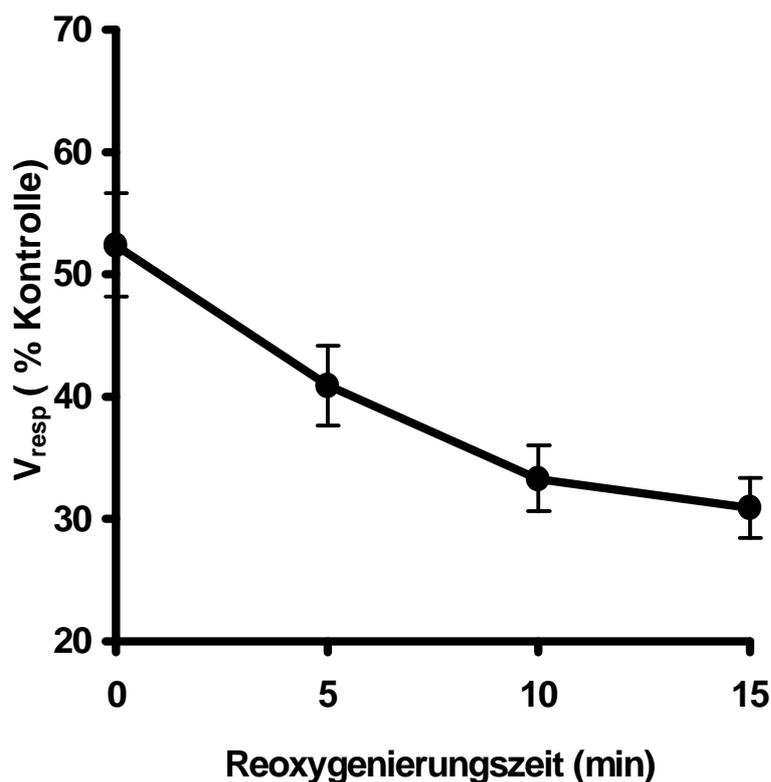


**Abbildung 2: Einfluss der Reoxygenierungszeit auf die aktive Atmung bei 1,8  $\mu\text{M}$  Ca-Ionen.** Rattenlebermitochondrien wurden bei 30° C substratfrei für 5 Minuten einer Hypoxie im Inkubationsmedium mit 1,8  $\mu\text{M}$  extramitochondrialen Ca-Ionen ausgesetzt. Die Bestimmung der aktiven Atmungsgeschwindigkeit ( $V_{\text{resp}}$ ) erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten nach Reoxygenierung und Zugabe von 5 mM Glutamat, 5 mM Malat und 200  $\mu\text{M}$  ADP. Die Daten sind als relative Größen, bezogen auf die aktive Atmung einer normoxischen Kontrollinkubation mit gleicher

Ca-Ionen-Konzentration, präsentiert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von 4 Mitochondrienpräparationen.

#### 4.1.3 Einfluss der Reoxygenierungszeit auf die aktive Atmung der Mitochondrien nach Zugabe von 3,6 $\mu\text{M}$ Ca-Ionen

Die Versuchsanordnung dieser Experimente entsprach der mit 1,8  $\mu\text{M}$  Ca-Ionen. Eine Konzentration von 3,6  $\mu\text{M}$  extramitochondrialen Ca-Ionen übersteigt den physiologischen Wert in der Zelle (200 nM).



**Abbildung 3: Einfluss der Reoxygenierungszeit auf die aktive Atmung bei 3,6  $\mu\text{M}$  Ca-Ionen.** Rattenlebermitochondrien wurden bei 30° C substratfrei für 5 Minuten einer Hypoxie im Inkubationsmedium mit 3,6  $\mu\text{M}$  extramitochondrialen Ca-Ionen ausgesetzt. Die Bestimmung der aktiven Atmungsgeschwindigkeit ( $V_{\text{resp}}$ )

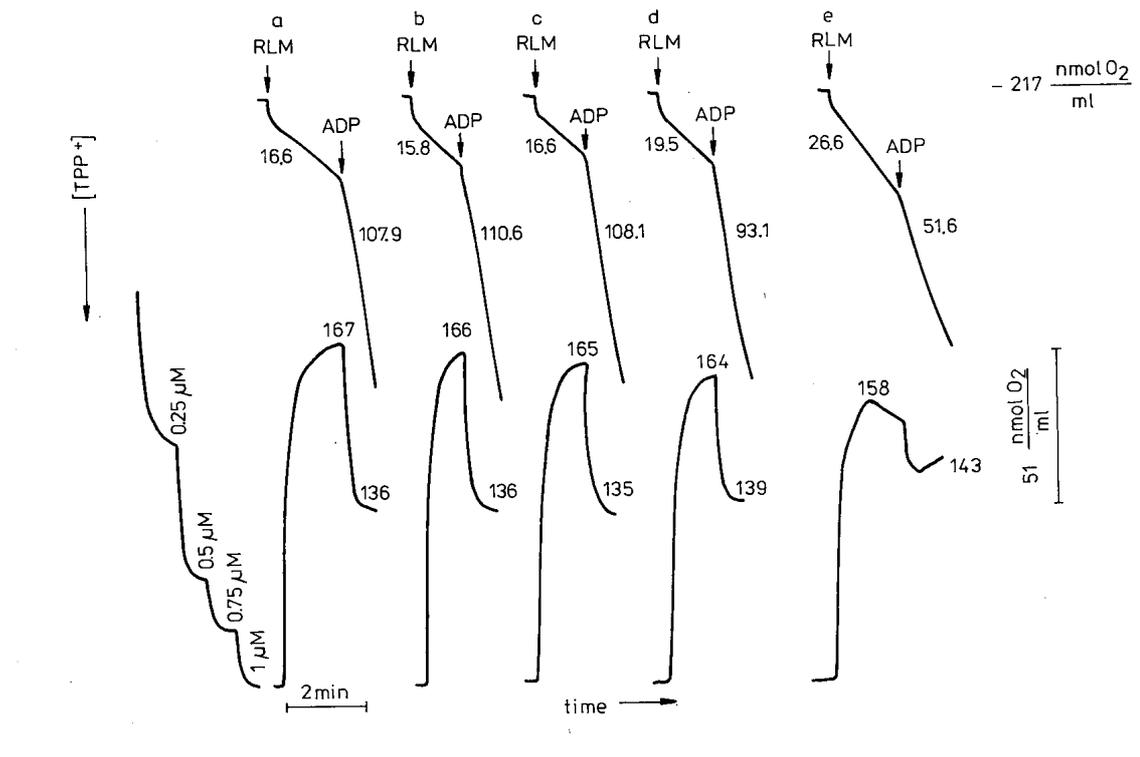
erfolgte zu den entsprechenden Zeitpunkten nach Reoxygenierung und Zugabe von 5 mM Glutamat, 5 mM Malat und 200  $\mu$ M ADP. Die Daten sind als relative Größen, bezogen auf die aktive Atmung einer normoxischen Kontrollinkubation mit entsprechender Ca-Ionen-Konzentration, präsentiert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von 4 Mitochondrienpräparationen.

Bei der Auswertung dieser Versuchsansätze wurden die Atmungsgeschwindigkeiten ohne Hypoxie und ohne Reoxygenierung (normoxische Kontrolle) und einer Ca-Ionen-Konzentration von 3,6  $\mu$ M als 100% gewertet (Abbildung 3)

Bei einer Konzentration von 3,6  $\mu$ M Ca-Ionen unterschied sich die aktive Atmung von der bei 1,8  $\mu$ M. Die Mitochondrien wurden durch die Ca-Ionen schon so stark geschädigt, dass nach einer Hypoxiedauer von 5 Minuten nur noch die halbe Atmungsgeschwindigkeit erreicht wurde. Mit nachfolgender Reoxygenierung verringerten sich die Geschwindigkeiten weiter. So erreichten die Atmungsgeschwindigkeiten nach 15 Minuten Reoxygenierung nur noch etwa 30% des Kontrollwerts ohne Hypoxie.

#### ***4.2 Einfluss ansteigender Ca-Ionen-Konzentrationen auf die aktive Atmung und das Membranpotential von isolierten Rattenlebermitochondrien ohne Hypoxie/Reoxygenierung***

Den Effekt von extramitochondrialen Ca-Ionen auf die aktive Atmung und das Membranpotential ohne Hypoxie/Reoxygenierung der frisch isolierten Rattenlebermitochondrien stellt die Abbildung 4 dar.



**Abbildung 4: Einfluss von Ca-Ionen auf die Atmung und das Membranpotential.** Rattenlebermitochondrien (1mg/ml) wurden bei verschiedenen Ca-Ionen-Konzentrationen im Inkubationsmedium inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden zur Stimulation der aktiven Atmung 5 mM Glutamat und 5 mM Malat und 200  $\mu\text{M}$  ADP zugesetzt. Die Zahlen an den oberen Kurven repräsentieren Atmungsgeschwindigkeiten in  $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  und an den unteren Kurven die Membranpotentiale in mV. Die Ca-Ionen-Konzentrationen waren: a=0  $\mu\text{M}$ , b=0,94  $\mu\text{M}$ , c=1,97  $\mu\text{M}$ , d=3,72  $\mu\text{M}$ , e=4,35  $\mu\text{M}$ . Die dargestellten Daten sind repräsentativ für 4 unabhängige Präparationen von Mitochondrien.

Die Respiration der Mitochondrien stieg mit Glutamat und Malat als Substraten ohne extramitochondriale Adeninnukleotide (Leak-Atmung) und auch nach Atmungsstimulation mit ADP, bis zu einer extramitochondrialen Ca-Ionen-Konzentration von 2  $\mu\text{M}$ , leicht an. Ab einer Konzentration von 3,72  $\mu\text{M}$  extramitochondrialer Ca-Ionen fiel die ADP-stimulierte Atmung auf 86 % der Ausgangsatmung ohne Ca-Ionen. Die Leak-Atmung stieg leicht an. Bei einer Konzentration von 4,35  $\mu\text{M}$  kam es zu einem drastischen

Anstieg der Leak-Atmung und zu einer stark eingeschränkten ADP-Sensitivität. Das mitochondriale Membranpotential wurde mit Hilfe einer Tetraphenylphosphonium (TPP<sup>+</sup>)-sensitiven Elektrode unter Einsatz von 1  $\mu\text{M}$  TPP<sup>+</sup> gemessen. Die Aufzeichnung erfolgte simultan zur Atmungsmessung.

Die Abbildung 4 zeigt, dass das mitochondriale Membranpotential bis zu einer Ca-Ionen-Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  keinen wesentlichen Veränderungen unterliegt. Der Aufbau des Potentials erfolgt schleichend und nach ADP-Zugabe sinkt es nicht auf das gewohnte Maß ab. Diese Veränderungen zeigen sich noch deutlicher bei einer extramitochondrialen Ca-Ionen-Konzentration von 4,35  $\mu\text{M}$ . Die Mitochondrien sind unter diesen Bedingungen nicht länger in der Lage, das mitochondriale Membranpotential aufrecht zu erhalten. Diese Bedingungen zwingen schließlich die Mitochondrienmembran dazu, die ‚MPTP‘ zu öffnen.

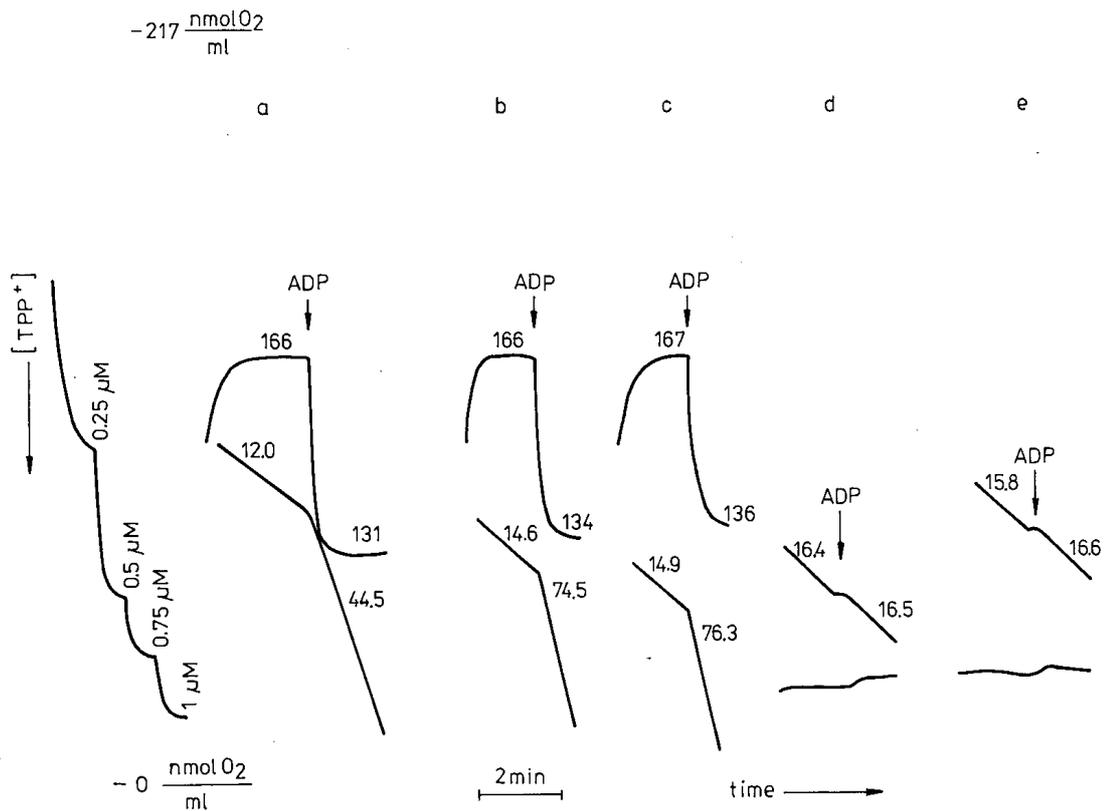
### ***4.3 Einfluss von extramitochondrialen Ca-Ionen auf die Atmung und das Membranpotential von frisch isolierten Rattenlebermitochondrien unter Hypoxie/Reoxygenierung***

Es ist bekannt, dass die Schädigung mitochondrialer Funktionen durch oxidativen Stress eine wichtige Rolle auf die gesamten Zellfunktionen bei Ischämie/Reperfusion ausübt (34). Es konnte gezeigt werden, dass die Beeinflussung der Ca-Ionen-Homöostase bei Ischämie-Reperfusion einen wichtigen Beitrag zu den Ereignissen, die den Zelltod hervorrufen, leistet. Nach einer Hypoxieperiode steigt die zytosolische Ca-Ionen-Konzentration während der Reoxygenierung auf 1-5  $\mu\text{M}$  an (35). Des weiteren konnte demonstriert werden, dass es in isolierten Rattenlebermitochondrien, bei

einer Hypoxie-/Reoxygenierungsexposition und in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  Ca-Ionen, zu einer Produktion hoher Mengen  $\text{H}_2\text{O}_2$  kommt. Offensichtlich regen Ca-Ionen, bei diesen Ca-Ionen-Konzentrationen, die Produktion von Wasserstoffperoxid an und es kommt in Folge dazu, dass durch die gebildeten Radikale wichtige SH-Gruppen in den Membranproteinen oxidiert werden.

Die eigenen Experimente dienten der Untersuchung des Effekts von Ca-Ionen auf die mitochondriale Funktion nach Hypoxie. Daraus ergab sich die Frage, wie sich verschiedene extramitochondriale Ca-Ionen-Konzentrationen auf die Mitochondrien auswirken, wenn sie der Hypoxie und anschließender Reoxygenierung ausgesetzt werden. Aus den 2 ml Inkubationsmedium mit den ausgewiesenen Ca-Ionen-Konzentrationen wurde der Sauerstoff durch  $\text{N}_2$  ausgetrieben. Dann erfolgte die Inkubation der Mitochondrien unter diesen hypoxischen Bedingungen für 5 Minuten. Die Reoxygenierung wurde durch 2 ml Inkubationsmedium mit den entsprechenden Ca-Ionen-Konzentrationen durchgeführt. Die Dauer der Reoxygenierung betrug stets 10 Minuten. Die Sauerstoffkonzentrationen und das Membranpotential wurden nach der Reoxygenierung registriert. Die Abbildung 5 zeigt die Wirkung von Hypoxie und Reoxygenierung bei verschiedenen Ca-Ionen-Konzentrationen auf die Rattenlebermitochondrien.

In Abwesenheit von extramitochondrialen Ca-Ionen und nach 5 Minuten Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung von 10 Minuten sank die aktive Atmung auf 41% der Kontrollatmung ab. Die Schädigung der mitochondrialen Funktionen zeigt sich durch die Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien. In Anwesenheit einer Ca-Ionen-Konzentration von 0,94  $\mu\text{M}$  und 1,97  $\mu\text{M}$  stellte sich ein protektiver Effekt von Ca-Ionen dar (b und c in der Abbildung 5). Die aktive Atmung der Rattenlebermitochondrien fiel nur auf 70% der Atmung der frisch isolierten Mitochondrien ab, die ohne Hypoxie und Reoxygenierung inkubiert wurden (Kontrolle).



**Abbildung 5: Einfluss von Ca-Ionen und Hypoxie/Reoxygenierung auf Atmung und Membranpotential.** Rattenlebermitochondrien (1mg/ml) wurden bei verschiedenen Ca-Ionen-Konzentrationen 5 Minuten Hypoxie und 10 Minuten Reoxygenierung ausgesetzt. Anschließend wurden die Substrate Glutamat (5 mM), Malat (5 mM) und zu den angegebenen Zeitpunkten zur Stimulation der aktiven Atmung 200  $\mu\text{M}$  ADP zugesetzt. Die Zahlen an den unteren Kurven repräsentieren Atmungsgeschwindigkeiten in  $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  und an den oberen Kurven die Membranpotentiale in mV. Die Ca-Ionen-Konzentrationen waren: a=0  $\mu\text{M}$ , b=0,94  $\mu\text{M}$ , c=1,97  $\mu\text{M}$ , d=3,72  $\mu\text{M}$ , e=4,35  $\mu\text{M}$ . Die dargestellten Daten sind repräsentativ für 4 unabhängige Präparationen von Mitochondrien.

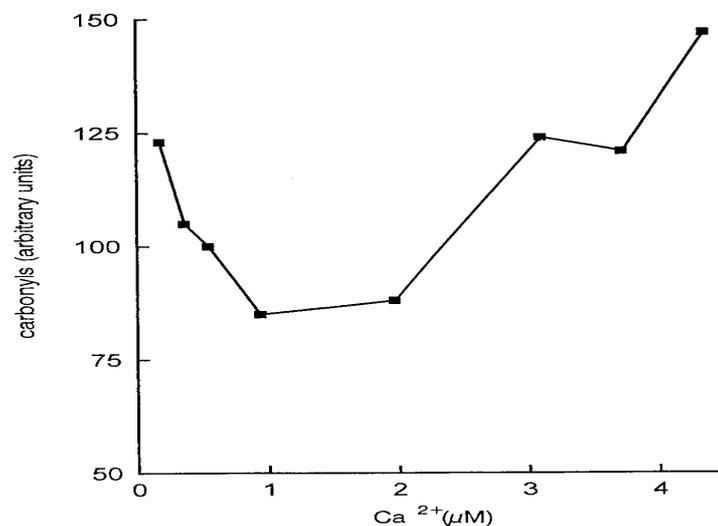
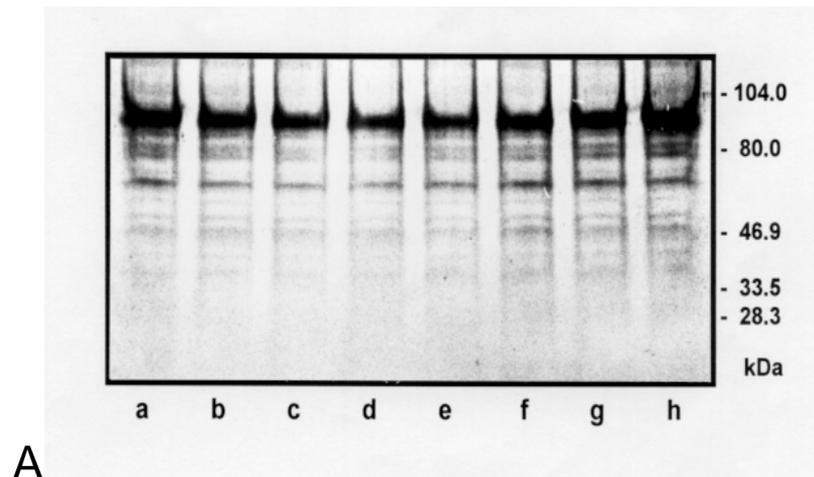
Bei Ca-Ionen-Konzentrationen ab 3,72  $\mu\text{M}$  und höher waren die Mitochondrien nicht mehr in der Lage, eine aktive Atmung zu realisieren und somit blieb die ADP-Sensibilität und auch die oxidative Phosphorylierung aus. Es zeigte sich, dass die mitochondrialen Membranen bei den Konzentrationen bis 1,97  $\mu\text{M}$  ein Membranpotential aufbauen

können, das nicht negativ von der Hypoxie und Reoxygenierung beeinflusst wird. Es ist sogar ein geringer Anstieg zu erkennen, so dass man auch beim Membranpotential von einer protektiven Wirkung von extramitochondrialen Ca-Ionen bei einer Konzentration bis 2  $\mu\text{M}$  sprechen kann. Übersteigt jedoch die Ca-Ionen-Konzentration den protektiven Bereich, so wird die innere Mitochondrienmembran permeabel und das Membranpotential bricht zusammen.

#### ***4.4 Proteinoxidation bei Hypoxie/Reoxygenierung***

Die Proben zur Bestimmung der Carbonyle entstammten aus den Inkubationen der Mitochondrien unter Hypoxie und Reoxygenierungsbedingungen bei verschiedenen Ca-Ionen-Konzentrationen. Da protein-gebundene Carbonyle die Schädigungen der Mitochondrien durch oxydaktiven Stress widerspiegeln, sollte gezeigt werden, dass sich bei den unterschiedlichen extramitochondrialen Ca-Ionen-Konzentrationen eine Änderung der Proteincarbonylmenge ergab. Das entsprechende Ergebnis ist in der Abbildung 6 dargestellt.

Die Abbildung zeigt deutliche Unterschiede der Carbonylbildung bei Hypoxie/Reoxygenierung und unterschiedlichen Ca-Ionen-Konzentrationen. Die Menge der Carbonyle nimmt bis zu einer Konzentration von 0,95  $\mu\text{M}$  ab und verbleibt in der protektiven Spanne auf diesen Minimumwerten. Ab einer höheren Konzentration ( $>3,1\mu\text{M}$ ) korreliert die Schädigung der mitochondriale Atmung mit dem massiven Anstieg der Carbonyle. Damit ist ein weiterer Beweis für den schützenden Effekt der extramitochondrialen Ca-Ionen erbracht worden.

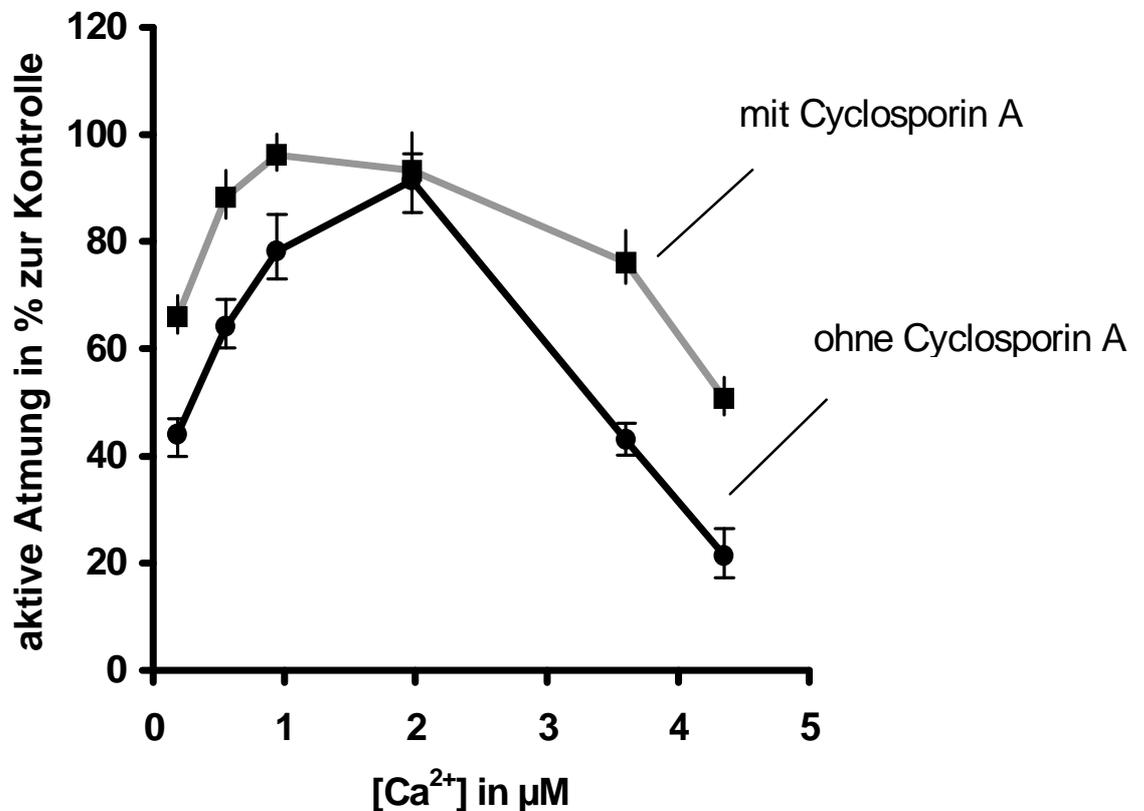


**Abbildung 6: Abhängigkeit des Gehalts von proteingebundenen Carbonylen nach 5 Minuten Hypoxie und 10 Minuten Reoxygenierung von der Ca-Ionen-Konzentration.** Rattenlebermitochondrien (1 mg/ml) wurden einer Hypoxie von 5 Minuten und 10 Minuten Reoxygenierung ausgesetzt. Nach dem Zusatz von 200 µM ADP wurden Proben zur Bestimmung der Carbonylgehalte entnommen. Die Ca-Ionen-Konzentrationen waren: a=0,18 µM, b=0,37 µM, c=0,55 µM, d=0,94 µM, e=1,97 µM, f=3,1 µM, g=3,7 µM, h=4,35 µM. Das Experiment ist typisch für 5 unabhängige Präparationen von Mitochondrien. Zur Quantifizierung der Carbonylgehalte wurde die Summe der Peakflächen der einzelnen Bahnen des Western Blots (A) densitometrisch bestimmt und in B dargestellt. Der Carbonylgehalt nach 5 Minuten Hypoxie und 10 Minuten Reoxygenierung bei 0,18 µM Ca-Ionen war  $8,36 \pm 0,93$  nmol/mg (n=5).

#### ***4.5 Wirkung von Cyclosporin A auf die aktive Atmung und das Membranpotential frisch isolierter Rattenlebermitochondrien unter Hypoxie und Reoxygenierungsbedingungen bei unterschiedlichen extramitochondrialen Ca-Ionen-Konzentrationen***

Die Wirkung des cyclischen Polypeptits Cyclosporin A in der Transplantationsmedizin als immunsuppressives Polypeptid ist hinlänglich bekannt (36). Es häufen sich jedoch auch Erkenntnisse darüber, dass Cyclosporin A eine antioxidative Potenz besitzt (37).

Daraus ergab sich für die hier beschriebenen Experimente die Fragestellung, inwieweit Cyclosporin A Einfluss auf die durch Hypoxie/Reoxygenierung geschädigte mitochondriale Atmung und das Membranpotential ausübt. Dazu wurden aus einer Mitochondrienpräparation zwei verschiedene Versuchswege beschrieben. Der erste glich denen der vorherigen Experimente und beschrieb demzufolge die protektive Wirkung von extramitochondrialen Ca-Ionen bei 5 Minuten Hypoxie und 10 Minuten Reoxygenierung in einem gut definierten Konzentrationsbereich zwischen 1 und 2  $\mu\text{M}$ . Der zweite Versuchsdurchlauf beinhaltete die gleichen Ca-Ionen-Konzentrationen, jedoch mit Cyclosporin A. So konnte ein direkter Vergleich erbracht werden, der durch den Wegfall unterschiedlicher und störender Präparations-einflüsse eine objektive Aussage zuließ. Um aus einer Präparation eine Versuchsreihe ohne und eine mit Cyclosporin A zu starten, wurden die Ca-Ionen-Konzentrationen auf 6 verschiedene Werte festgelegt. Die Konzentration des zugesetzten Cyclosporin A betrug 2  $\mu\text{M}$ . Ansonsten erfolgte die Aufzeichnung der Atmung und des Membranpotentials entsprechend den in den vorherigen Experimenten angewandten Abläufen. In der Abbildung 7 ist der direkte Vergleich zwischen der aktiven Atmung von Rattenlebermitochondrien einer Cyclosporin A -freien und einer Cyclosporin A -Inkubation mit unterschiedlichen Ca-Ionen-Konzentrationen dargestellt.



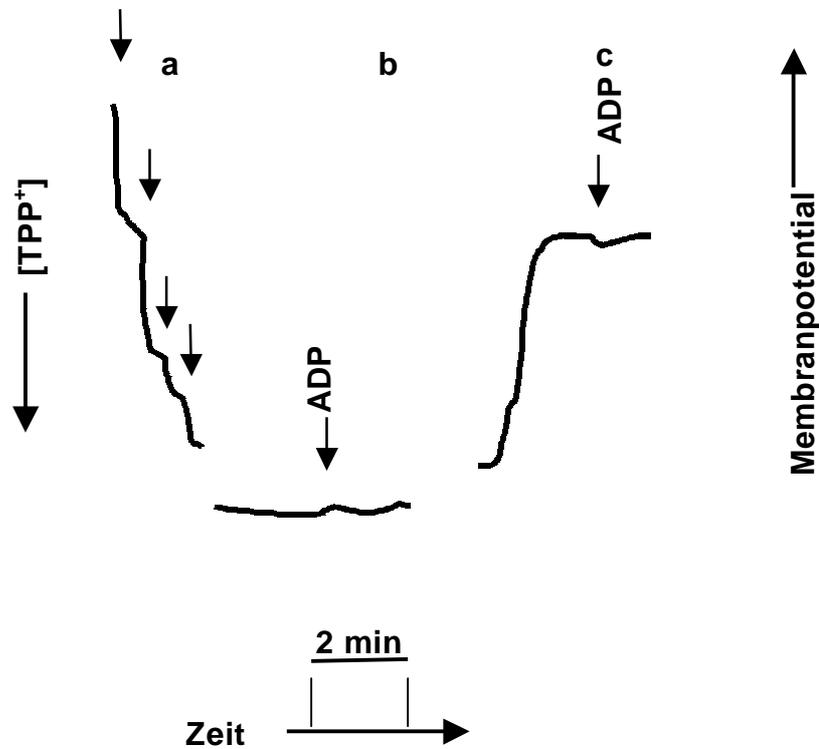
**Abbildung 7: Wirkung von Cyclosporin A und Ca-Ionen auf die aktive Atmung isolierter Rattenlebermitochondrien.** Rattenlebermitochondrien (1mg/ml) wurden bei verschiedenen Ca-Ionen-Konzentrationen ohne und mit Zugabe von 2  $\mu\text{M}$  Cyclosporin 5 Minuten Hypoxie und 10 Minuten Reoxygenierung ausgesetzt. Die aktive Atmung wurde nach Zusatz von 5 mM Glutamat, 5 mM Malat und 200  $\mu\text{M}$  ADP gemessen. Die Atmungsgeschwindigkeiten sind in Prozent der Kontrollatmungen (ohne Hypoxie/Reoxygenierung und Ca-Ionen) dargestellt. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte von 4 unabhängigen Präparationen.

Der Präventionseffekt der extramitochondrialen Ca-Ionen ist im Bereich zwischen 0,55  $\mu\text{M}$  und 1,97  $\mu\text{M}$  deutlich zu erkennen. Ohne Cyclosporin A fiel die Atmungsgeschwindigkeit ab einer Konzentration von 3,6  $\mu\text{M}$  auf 61% der Initialatmung ab. Unter Einfluss von Cyclosporin A kehrt sich der Präventionseffekt noch deutlicher heraus. Bei Inkubationen mit Ca-Ionen-Konzentrationen ohne Effekt auf die Atmung (0,18  $\mu\text{M}$ ), bewirkte

Cyclosporin A eine deutliche Anhebung der Atmung. Dieser Trend setzte sich bis zum Ende fort. Im Präventionsbereich (bei 1,8  $\mu\text{M}$  Ca-Ionen) verstärkte Cyclosporin A die Wirkung der extramitochondrialen Ca-Ionen um etwa 20%. Außerdem verschob sich das Präventionsmaximum unter Cyclosporin A in Richtung niedriger Ca-Ionen-Konzentrationen. Bei den hohen Ca-Ionen-Konzentrationen ab 3,6  $\mu\text{M}$  verzögerte das Polypeptid den Abfall der Atmung. So erreichte die mitochondriale Atmung bei einer Konzentration von 4,38  $\mu\text{M}$  unter Cyclosporin A noch 72% der Initialatmung.

Beim Membranpotential ergaben sich ähnliche Resultate. Das mitochondriale Membranpotential hielt unter Hypoxie und Reoxygenierung einer Ca-Ionen-Konzentration bis 3  $\mu\text{M}$  stand. Konzentrationen im Präventionsbereich der Ca-Ionen beeinflussten den Aufbau des mitochondrialen Potentials positiv. Ab einer Konzentration von 3,6  $\mu\text{M}$  waren die Mitochondrien, durch den Wegfall der oxidativen Phosphorylierung, nicht mehr in der Lage, dieses Potential aufrechtzuerhalten und es brach zusammen. Cyclosporin A nahm in diesem Ca-Ionen -Bereich Einfluss auf das Membranpotential. Es bewirkte, dass das Membranpotential aufrechterhalten blieb. Auch bei einer Konzentration von 4,35  $\mu\text{M}$  wurde von den Mitochondrien ein Membranpotential aufgebaut (Abbildung 8).

In Gegenwart von Cyclosporin A betrug das Membranpotential  $117 \pm 3$  mV (c). Ohne Cyclosporin A (b) war kein Membranpotential messbar. ADP war ohne signifikanten Einfluss.



**Abbildung 8: Wirkung von Cyclosporin A auf das Membranpotential nach Hypoxie/Reoxygenierung in Gegenwart von Ca-Ionen.**

Rattenlebermitochondrien (1 mg/ml) wurden in Gegenwart von 4,35  $\mu\text{M}$  Ca-Ionen 5 Minuten Hypoxie und 10 Minuten Reoxygenierung in Abwesenheit (b) oder in Gegenwart von 2  $\mu\text{M}$  Cyclosporin A (c) ausgesetzt. Zur Quantifizierung der Messdaten wurde zusätzlich eine Eichkurve aufgenommen (a). Dazu wurden dem Inkubationsmedium schrittweise an den gekennzeichneten Zeitpunkten 5  $\mu\text{M}$   $\text{TPP}^+$  (Endkonzentration) zugesetzt und die Änderung des elektrischen Potentials gemessen. Die Berechnung des Membranpotentials erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Das  $\text{TPP}^+$ -Signal wurde im Anschluss an Hypoxie/Reoxygenierung nach Zugabe von 5 mM Glutamat, 5 mM Malat und 20  $\mu\text{M}$   $\text{TPP}^+$  gemessen. Das Experiment ist typisch für 4 Präparationen von Mitochondrien.

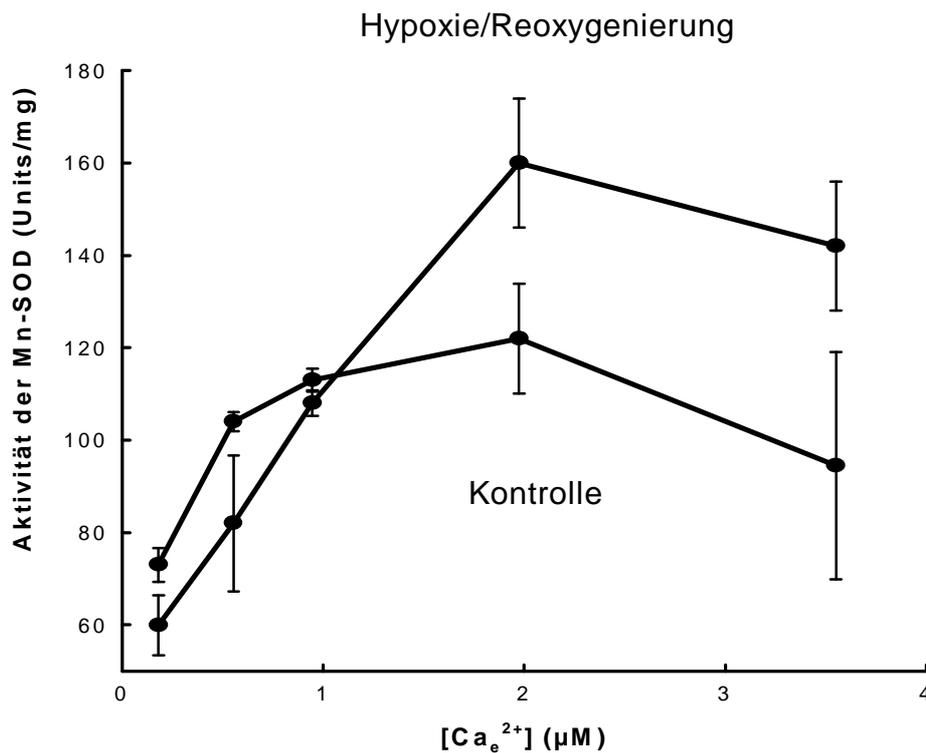
## **4.6 Aktivität der Mn-Superoxiddismutase**

### **4.6.1 Abhängigkeit der Aktivität der Mn-Superoxiddismutase (Mn-SOD) von der extramitochondrialen Ca-Ionen-Konzentration mit/ohne Hypoxie/Reoxygenierung**

Die Produktion des Superoxidanionenradikals in den Mitochondrien ist eine Ursache für den oxidativen Stress. Sie spielt eine große Rolle bei der Schädigung wichtiger zellulärer Verbindungen. So führen oxidative Schädigungen besonders an Membranlipiden zur Entstehung von Lipidperoxiden (38). Die Entgiftung des Superoxidanionenradikals erfolgt über die Superoxiddismutase, die Glutathionperoxidase und die Glutathionreduktase. Hypoxie/Reoxygenierung in Gegenwart von extramitochondrialen Ca-Ionen verursachen oxidativen Stress (siehe Kapitel 4.4). Deshalb beschäftigen sich die folgenden Kapitel mit den enzymatisch-mitochondrialen Fähigkeiten, reaktive Sauerstoffspezies zu entgiften. Die Proben zur Bestimmung der Aktivitäten von Schutzenzymen entstammen aus den Inkubationen der beschriebenen Experimente. Dazu wurden die Mitochondrien durch dreimaliges Tauen und Frieren aufgeschlossen. Dies ermöglichte dann die Bestimmung der Enzymaktivitäten.

Wie in der Methodik aufgeführt, war die Aktivität der Mn-Superoxiddismutase, die Reduktionsrate des Cytochrom c im Xanthin/Xanthinoxidase-System, welches als Quelle für das Superoxidanionenradikal fungierte. Die Mn-SOD verringerte also die durch das Superoxidanionenradikal hervorgerufene Reduktion des Cytochrom c. Mit Hilfe einer Eichkurve, durch Standard-SOD aus Rindererythrozyten, wurden die Aktivität ermittelt.

Es wurden die Aktivitäten der Mn-SOD bei unterschiedlichen Ca-Ionen-Konzentrationen unter Hypoxie und Reoxygenierungsbedingungen sowie die Mn-SOD-Aktivitäten bei unterschiedlichen extramitochondrialen Ca-Ionen-Konzentrationen ohne Hypoxie und Reoxygenierung (Kontrolle) bestimmt. In Abbildung 9 sind die entsprechenden Daten dargestellt.



**Abbildung 9: Abhängigkeit der Aktivität der Mn-SOD von Ca-Ionen und Hypoxie/Reoxygenierung.** Rattenlebermitochondrien (1mg/ml) wurden bei verschiedenen Ca-Ionen-Konzentrationen ([Ca<sub>e</sub><sup>2+</sup>]) entweder mit 5 mM Glutamat und 5 mM Malat inkubiert oder 5 Minuten Hypoxie und 10 Minuten Reoxygenierung ausgesetzt. Zur Bestimmung der Aktivität der Mn-SOD wurden 500 µl-Proben entnommen. Die Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung von 4 Mitochondrienpräparationen

Die Mn-Superoxiddismutase änderte ihre Aktivität durch unterschiedliche extramitochondriale Ca-Ionen-Konzentrationen. So stieg die Aktivität bei Konzentrationen um 2 µM ohne Hypoxie/Reoxygenierung auf etwa das

Doppelte an. Ihr Maximum erreichte die Aktivität unter diesen Bedingungen bei 2,0  $\mu\text{M}$  Ca-Ionen. Bis zu einer Konzentration von etwa 4  $\mu\text{M}$  fiel sie wieder auf ihren Ausgangswert von durchschnittlich 80 units/mg ab. Die Aktivitätsmessungen der Mn-SOD von Mitochondrien, die der Hypoxie und der anschließenden Reoxygenierung ausgesetzt waren, ergaben die folgenden Werte in Abhängigkeit von den extramitochondrialen Ca-Ionen:

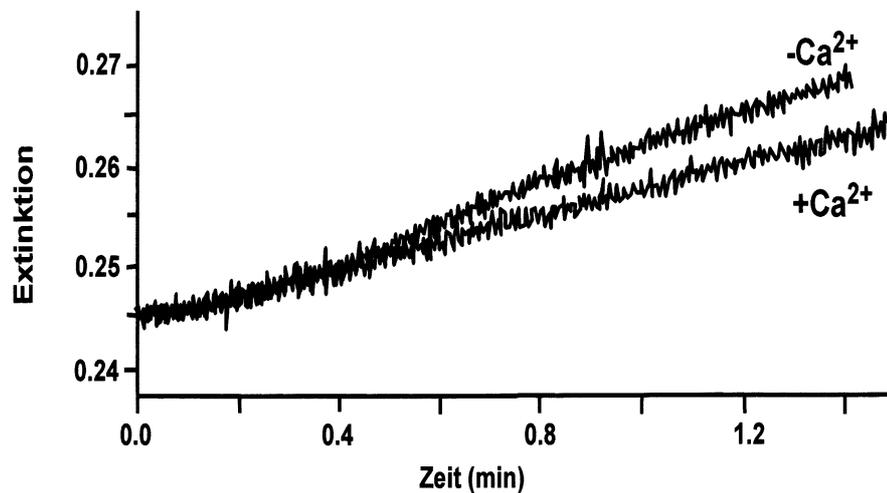
Der Ausgangswert der Enzymaktivität (0,2  $\mu\text{M}$ ) lag etwas unter dem ohne Hypoxie/Reoxygenierung, überkreuzt dann jedoch die andere Kurve, um auf ein Maximum anzusteigen, welches um das 3-fache höher lag als der Ausgangswert. Die Kurve erreichte im Vergleich zur anderen linear ihren Gipfel. Die zum Maximum gehörige Ca-Ionen-Konzentration betrug 2,0  $\mu\text{M}$ . In diesem Bereich besteht der bekannte präventive Ca-Ionen-Gipfel in Hinblick auf die Atmung (siehe Abbildung 5). Auch der Abfall der Aktivität verlief moderater.

Um eine pH-Wert-Beeinflussung auszuschließen, wurde dieser in verschiedenen Ansätzen gemessen. Der pH-Wert blieb unter den Versuchsbedingungen konstant. Es stellte sich die Frage, inwieweit Ca-Ionen auf die Aktivität der Xanthinoxidase Einfluss nahmen und somit die Messmethode beeinflussten. Dazu wurden Bestimmungen der Aktivität der Xanthinoxidase bei unterschiedlichen Ca-Ionen-Konzentrationen vorgenommen, ohne dass diese Ansätze Mn-SOD aus den Proben enthielten. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Xanthinoxidase nicht durch Ca-Ionen beeinflusst wird.

#### **4.6.2 Einfluss von Ca-Ionen auf die Aktivität kommerzieller Mn-SOD (Standard-SOD)**

Nach den Ergebnissen des Effektes von extramitochondrialen Ca-Ionen auf die mitochondriale Mn-Superoxiddismutase stellte sich die Frage, ob Ca-Ionen einen ähnlichen Einfluss auf eine Standard-Superoxiddismutase

nehmen. Dazu wurde Standard-SOD aus Rindererythrozyten mit Ca-Ionen versetzt. Die Menge der verwendeten Standard-SOD betrug 2,2 units und die zugesetzten Konzentrationen von Ca-Ionen betragen 1,3  $\mu\text{M}$ , also die Konzentration, bei der die Präventionswirkung auftrat. Durch diese experimentelle Anordnung konnte der direkte Einfluss von Ca-Ionen auf die Aktivität der Superoxiddismutase untersucht werden. Um die Wirkung der Ca-Ionen auf die SOD-Aktivität deutlich zu machen, ist in der Abbildung 10



das Messprotokoll abgebildet.

**Abbildung 10: Abhängigkeit der Aktivität der Standard-Mn-SOD von Ca-Ionen.** Die Bestimmung erfolgte wie in Material und Methoden dargestellt. Die eingesetzte Ca-Ionen-Konzentration wurde durch CaEGTA-Puffer (1,3  $\mu\text{M}$ ) oder

durch Zusatz von 10 mM EGTA eingestellt. Das gezeigte Experiment ist typisch für 4 durchgeführte Untersuchungen.

Es konnte gezeigt werden, dass Ca-Ionen einen direkten Einfluss auf die Superoxiddismutase ausüben. Der Zusatz von EGTA zu den 1,3  $\mu\text{M}$  Ca-Ionen bewirkte dagegen die Abnahme der Aktivität der Standard-SOD von 1,85 units/mg(mitochondriales Protein) auf 0,134 units/mg ( mitochondriales Protein).

#### **4.6.3 Einfluss von Ca-Ionen und Hypoxie/Reoxygenierung auf den Gehalt an Mn- Superoxiddismutase**

In den vorherigen Kapiteln wurde die enzymatische Aktivität der Mn-Superoxiddismutase untersucht. Nun war die Frage zu klären, ob die gesteigerte Aktivität auf einen quantitativen Anstieg der Superoxiddismutase zurückzuführen ist.

Mit Hilfe des Western-Blots konnten die spezifische Proteinmengen aus den unterschiedlichen Inkubationen dargestellt werden.

Die Abbildung 11 zeigt, dass die Proteinmengen der einzelnen Inkubationen konstant blieb. Die gesteigerte Aktivität der Mn-Superoxiddismutase wird demnach nicht durch eine gesteigerte Bildung der Enzyme hervorgerufen.



**Abbildung 11: Abhängigkeit der Mn-SOD- Menge von der extramitochondrialen Ca-Ionen-Konzentrationen und Hypoxie/Reoxygenierung.** Rattenlebermitochondrien wurden bei 30°C in Gegenwart von unterschiedlichen Ca-Ionen-Konzentrationen inkubiert (A) und 5 Minuten Hypoxie und 10 Minuten Reoxygenierung ausgesetzt (B). Die Darstellung der Mn-SOD mittels Western Blot erfolgte wie in den Methoden beschrieben. Die Ca-Ionen-Konzentrationen waren: **1**=0,18 µM; **2**= 0,55 µM; **3**= 0,95 µM; **4**= 1,97 µM; **5**= 3,55 µM; **6**= 5,65 µM.

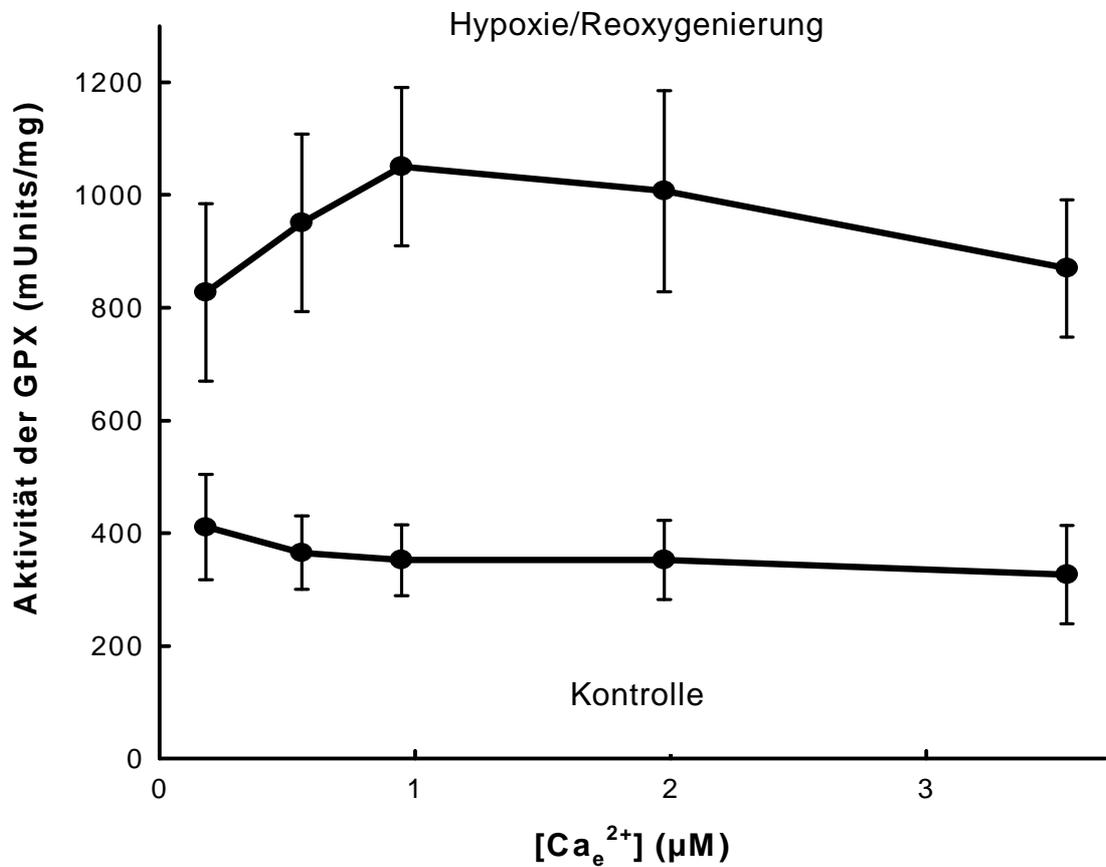
Auf den ersten Bahnen wurde ein Proteinstandardgemisch (**S**) aufgetragen. Das Experiment ist repräsentativ für 4 Mitochondrienpräparationen.

#### ***4.7 Aktivität der Glutathionperoxidase unter Hypoxie- und Reoxygenierungsbedingungen in Gegenwart von extramitochondrialen Ca-Ionen***

Die Glutathionperoxidase übernimmt das Wasserstoffperoxid der Superoxiddismutase und wandelt es in Wasser um. Dabei wird Glutathion oxidiert und durch die Glutathionreduktase mit Hilfe von NADPH zurückreduziert. Die Oxidation von NADPH zu NADP<sup>+</sup> lässt sich bei einer Wellenlänge von 340 nm in einem Photometer messen. Dabei ist die Änderung der Extinktion über die Zeit direkt proportional zur Aktivität der Glutathionperoxidase.

Die Proben dieser Messungen entstammten aus den jeweiligen Inkubationen in den Atmungsmesszellen. Die Mitochondrien wurden durch dreimaliges Tauen und Frieren aufgeschlossen und der Aktivitätsbestimmung der Glutathionperoxidase zugeführt. In Abbildung 12 ist die Aktivität der Glutathionperoxidase in Abhängigkeit von Ca-Ionen und von Hypoxie/Reoxygenierung dargestellt.

Die Abbildung zeigt, dass die Änderung der extramitochondrialen Ca-Ionen-Konzentration (Kontrolle) für sich alleine keine Aktivitätsänderung bewirkte. Der scheinbare Abfall der Aktivität der Glutathionperoxidase bis 1  $\mu$ M Ca-Ionen unter normalen Bedingungen erfüllt jedoch nicht die Signifikanzkriterien.



**Abbildung 12: Abhängigkeit der Aktivität der Glutathionperoxidase von Ca-Ionen und Hypoxie/Reoxygenierung.** Rattenlebermitochondrien (1mg/ml) wurden bei verschiedenen Ca-Ionen-Konzentrationen ( $[Ca_e^{2+}]$ ) entweder nur mit 5 mM Glutamat und 5 mM Malat inkubiert (Kontrolle) oder zusätzlich 5 Minuten Hypoxie und 10 Minuten Reoxygenierung ausgesetzt. Zur Bestimmung der Aktivität der Glutathionperoxidase wurden 500  $\mu l$  Proben entnommen. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 4 Mitochondrienpräparationen

Ab einer Konzentration von 1  $\mu M$  änderte sich auch beim weiteren Anstieg der Ca-Ionen-Konzentration die Aktivität nicht. Stiegen die extramitochondrialen Ca-Ionen-Konzentrationen unter hypoxischen Bedingungen an, so erkannte man eine massive Erhöhung der

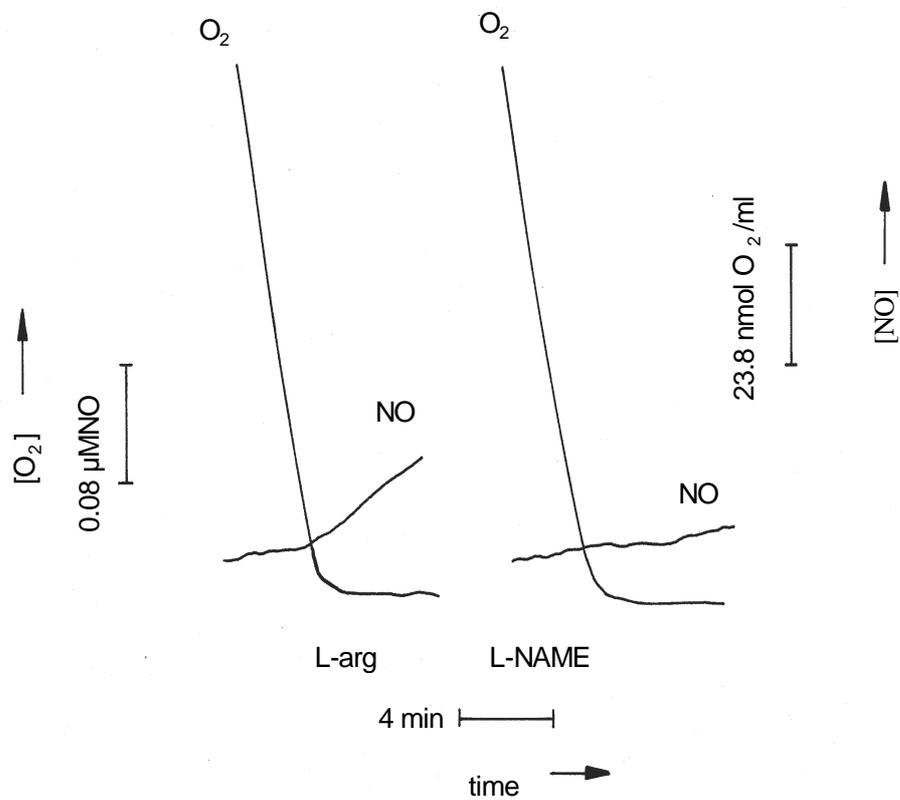
Enzymaktivität. So war die Aktivität in Abwesenheit von Ca-Ionen unter Hypoxie/Reoxygenierung etwa doppelt so hoch im Vergleich zu den normoxischen Bedingungen. Bis zu einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  verdoppelte sich im Vergleich zum Ausgangswert (0  $\mu\text{M}$ ) die Aktivität der Glutathionperoxidase. Ab dieser Konzentration fiel sie bis zu einer Konzentration von 3,6  $\mu\text{M}$  auf ihren Ausgangswert ab. Es zeigte sich, dass die Aktivität der Glutathionperoxidase nur dann Ca-Ionen-sensitiv war, wenn die Mitochondrien einer transienten Hypoxie ausgesetzt wurden. Da auch bei diesen Messungen eine pH-Beeinflussung ausgeschlossen werden musste, wurden bei den unterschiedlichen Ca-Ionen-Konzentrationen pH-Messungen durchgeführt. Sie ergaben, dass sich der pH-Wert bei unterschiedlichen Ca-Ionen-Konzentrationen nicht änderte.

#### ***4.8 NO-Konzentration unter hypoxischen Bedingungen***

Es ist bekannt, dass Lebermitochondrien eine NO-Synthetase besitzen (11). Stickstoffmonoxid (NO) hemmt kompetitiv die Cytochromoxidase (Komplex 4 der Atmungskette). Um die Rolle von NO bei der Hypoxie und der Reoxygenierung zu untersuchen, wurde zunächst die NO-Konzentration bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen gemessen.

Die Substanz L-Name ist ein kompetitiver Hemmstoff der NO-Synthetase. Ziel der Untersuchungen war es herauszufinden, wie NO die Atmung nach Hypoxie/Reoxygenierung in Gegenwart von Ca-Ionen beeinflusst, indem die NO-Produktion durch L-NAME gehemmt wurde.

Um einen besseren Überblick über die Zusammenhänge zu haben, sind in der Abbildung 13 sowohl die Sauerstoffkonzentration wie auch die Stickstoffmonoxidkonzentration zeitlich zueinander dargestellt. Die Abbildung zeigt ein typisches Versuchsprotokoll. Die Versuche wurden an vier unterschiedlichen Präparationen durchgeführt.

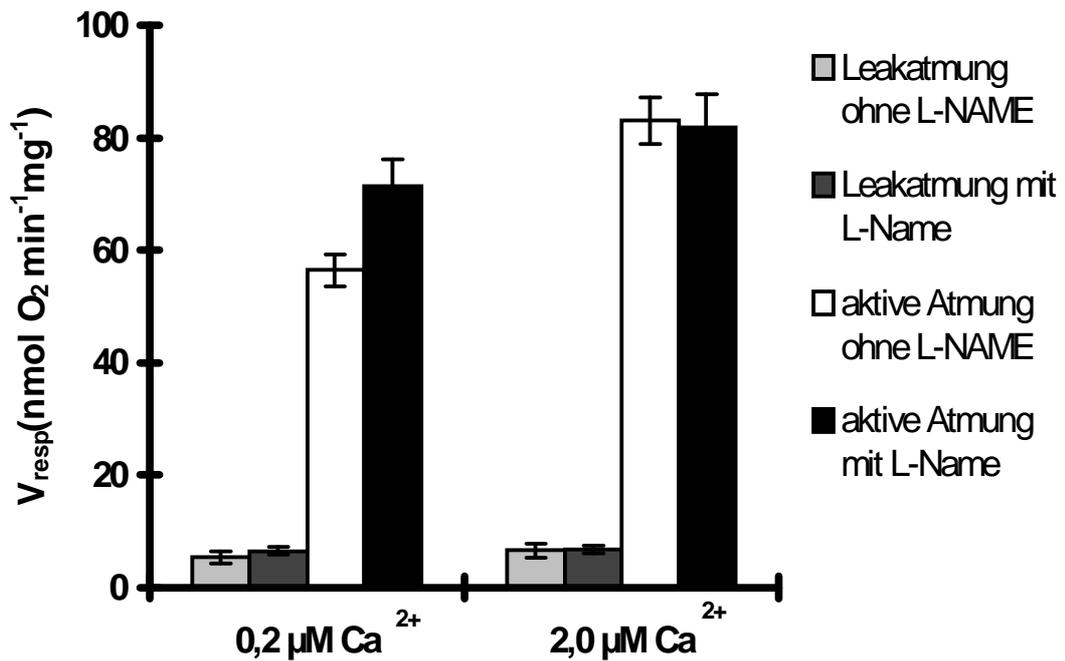


**Abbildung 13: Abhängigkeit der freien NO-Konzentration von der Sauerstoffkonzentration.** Rattenlebermitochondrien (1 mg/ml) wurden bei 30° C in Gegenwart von 5 mM Glutamat, 5 mM Malat und 5 mM L-Arginin inkubiert. Zur Ermittlung der angegebenen Skalierungswerte für die  $O_2$ - und NO-Messung wurden in unabhängigen Ansätzen die NO-Sensitivität anhand von Eichlösungen und die Kalibrierung der Sauerstoffelektrode unter Nutzung der Messwerte bei Sauerstofffreiheit (Na-Dithionit) und Luftsättigung (217 nmol  $O_2$  /ml) vorgenommen. Im zweiten Ansatz wurde die NO-Synthese mit 5 mM L-NAME gehemmt. Das dargestellte Experiment ist repräsentativ für 4 Mitochondrienpräparationen.

Die vollständige Hypoxie der Mitochondrien wurde mit Hilfe des Durchblasens mit  $N_2$  bis etwa 98% erreicht. Die verbliebenden 2% Sauerstoff brauchten die Mitochondrien durch ihre Atmung fast vollständig auf. In einer derartigen Inkubation trat nach etwa einer Minute eine strenge Hypoxie ein. Interessant ist bei den hier durchgeführten Experimenten, dass die Stickstoffmonoxidkonzentration in Gegenwart hoher  $O_2$ -Konzentrationen keine Änderung zeigte. Dagegen kam es nach der Hypoxie zu einem Anstieg des NO-Gehaltes im Medium. Eine Interferenz zwischen  $O_2$  und NO konnte ausgeschlossen werden, da die NO-Elektrode spezifisch auf Stickstoffmonoxid reagierte.

#### ***4.9 Wirkung von NO auf die Atmung der Mitochondrien nach Hypoxie und Reoxygenierung bei zwei unterschiedlichen extramitochondrialen Ca-Ionen-Konzentrationen***

Der Einfluss von NO auf die Atmung nach Hypoxie/Reoxygenierung wurde bei zwei Ca-Ionen-Konzentrationen untersucht. Zum einen lag sie in dem Bereich der extramitochondrialen Ca-Ionen-Konzentration, in dem noch kein präventiver Effekt zu erzielen war ( $0,2\mu M$ ). Zum anderen wurde eine Ca-Ionen-Konzentration mit einem protektiven Einfluss auf die Atmung gewählt ( $2\mu M$ ). Die Inkubationsbedingungen bestanden in der Hypoxiedauer von 5 Minuten und einer Reoxygenierungslänge von 10 Minuten. Die Konzentration von L-NAME war in der hypoxischen Phase mit der der Reoxygenierungsphase identisch und betrug 5 mM.



**Abbildung 14: Wirkung von NO auf die Atmung ( $V_{resp}$ ) frisch isolierter Rattenlebermitochondrien.** Die Rattenlebermitochondrien wurden 5 Minuten Hypoxie und 10 Minuten Reoxygenierung bei  $0,2 \mu\text{M Ca}$ -Ionen oder  $2 \mu\text{M Ca}$ -Ionen ausgesetzt. Die Konzentrationen des Hemmstoffes der NO-Synthase L-NAME betrug  $5 \text{ mM}$ . Die Atmung wurde nach Zugabe von  $5 \text{ mM}$  Glutamat und  $5 \text{ mM}$  Malat ermittelt. Bestimmt wurden jeweils die Atmungsgeschwindigkeiten vor (Leakatmung) und nach Zugabe von  $200 \mu\text{M ADP}$  (aktive Atmung). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 4 Mitochondrienpräparationen.

Der Effekt von L-NAME zeigte sich im Bereich niedriger extramitochondrialer Ca-Ionen-Konzentration ( $0,2 \mu\text{M}$ ). In diesem Bereich verstärkte L-NAME den mitochondrialen Verbrauch von Sauerstoff und stellte damit ein Indiz dafür dar, dass NO an der Hemmung der Atmung beteiligt ist (Abbildung 14). Betrachtet man in diesem Bereich die Leak-Atmung, so kann man keinen Unterschied erkennen. Im präventiven Bereich

extramitochondrialer Ca-Ionen bewirkte L-NAME keine nennenswerte Beeinflussung. Auch die Leak-Atmung wurde nicht geändert. Die Hemmung der NO-Synthese unter Hypoxie und Reoxygenierung hatte nur im Bereich niedriger und sehr hoher Ca-Ionen-Konzentrationen Einfluss auf die mitochondriale Atmung.

#### **4.10 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Die Ergebnisse der Experimente sind sehr komplex. Zum besseren Überblick sind sie nachfolgend in zwei Kategorien zusammengefasst.

##### **4.10.1 Modulation der Atmung und der Membranpermeabilität durch Ca-Ionen und Hypoxie/Reoxygenierung**

Um die Wirkung von extramitochondrialen Ca-Ionen auf die Mitochondrien unter Hypoxie/Reoxygenierung zu erforschen, wurden Rattenlebermitochondrien 5 Minuten Hypoxie und anschließend 10 Minuten Reoxygenierung in Gegenwart von bis zu 5  $\mu\text{M}$  Ca-Ionen ausgesetzt und anschließend die Atmung analysiert. Temporäre Hypoxie ohne Ca-Ionen bewirkte eine Abnahme der aktiven Atmung auf etwa 42 % der normoxischen Kontrolle. Extramitochondriale Ca-Ionen modifizierten die Beeinträchtigung der aktiven Atmung durch Hypoxie und Reoxygenierung. Bis zu einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  übten Ca-Ionen eine schützende Wirkung aus, denn bei dieser Konzentration kam es nach Hypoxie /Reoxygenierung noch zu einer aktiven Atmung von 87%. Ca-Ionen -Konzentrationen über 2  $\mu\text{M}$  bewirkten dagegen die Abnahme und das Erlöschen der Atmung.

Um zu prüfen, ob die Beeinträchtigung der aktiven Atmung durch Ca-Ionen mit dem Öffnen der MPTP zusammenhängt, wurden zusätzlich zur Hypoxie/Reoxygenierung und den Ca-Ionen Cyclosporin A eingesetzt. Die Sensitivität der aktiven Atmung auf das Cyclosporin A lässt auf das Öffnen der MPTP schließen. Zwischen 0,5  $\mu\text{M}$  und 3,6  $\mu\text{M}$  extramitochondrialer Ca-

Ionen wurden Rattenlebermitochondrien gegen vorübergehende Hypoxie fast vollständig geschützt. Bei einer Konzentration von 4,3  $\mu\text{M}$  Ca-Ionen, war jedoch eine Anregung der aktiven Atmung nicht mehr zu erreichen. Zusätzlich brach das Membranpotential zusammen. In Gegenwart vom Cyclosporin A waren die Ca-Ionen nach Hypoxie/Reoxygenierung zum Aufbau eines Membranpotentials von 123 mV im Stande (Abbildung 8).

#### **4.10.2 Regulierung der antioxidativen Verteidigung durch extramitochondriale Ca-Ionen bei Hypoxie/Reoxygenierung**

Um zu erforschen, ob Ca-Ionen den antioxidativen Schutz während Hypoxie/Reoxygenierung beeinflussen, wurde die Aktivität der Mn-Superoxiddismutase und der Glutathionperoxidase nach 5 Minuten Hypoxie und 10 Minuten Reoxygenierung bei verschiedenen Ca-Ionen-Konzentrationen bestimmt.

Die Aktivität der Mn-Superoxiddismutase war bei einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  Ca-Ionen am höchsten (Abbildung 9). Erstaunlich war, dass die Aktivität der Mn-Superoxiddismutase bei dieser Konzentration unter Hypoxie/Reoxygenierung bedeutend höher war als unter normoxischen Bedingungen (157 gegen 118 units/mg). Nahm man eine Konzentration zwischen 0,2  $\mu\text{M}$  und 2  $\mu\text{M}$  Ca-Ionen, so resultierte ein Aktivitätssteigerung um das 2,6-fache bei Hypoxie/Reoxygenierung, wohingegen bei gleicher Ca-Ionen-Konzentration unter normoxischen Bedingen nur eine Steigerung um das 1,6-fache zu erreichen war. Die Kombination aus Hypoxie/Reoxygenierung und einer Ca-Ionen-Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  bewirkte eine beträchtliche Zunahme der Aktivität dieses antioxidativen Schutzenzyms.

Im Vergleich zur Mn-Superoxiddismutase war die Aktivität der Glutathionperoxidase im niedrigen mikromolaren Ca-Ionen -Bereich nicht Ca-Ionen-sensitiv, wohl aber reagierte sie mit einer Aktivitätssteigerung auf

Hypoxie/Reoxygenierungsbedingungen. Sie war bei niedrigen mikromolaren Ca-Ionen-Konzentrationen in ihrer Aktivität nach 5 Minuten Hypoxie und 10 Minuten Reoxygenierung doppelt so hoch wie unter normoxischen Bedingungen (819 gegen 405 units/mg bei 0,2  $\mu\text{M}$ ).

Im Bereich zwischen 1  $\mu\text{M}$  und 2  $\mu\text{M}$  extramitochondrialer Ca-Ionen war die Aktivitätssteigerung Ca-Ionen-abhängig. Ähnlich wie die Mn-Superoxiddismutase verursachte die Hypoxie/Reoxygenierung bei einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  Ca-Ionen eine beträchtliche Aktivitätszunahme der Glutathionperoxidase um etwa 25 %.

Oxidative Schäden werden durch Superoxid-Anionen-Radikale, die innerhalb der Elektronen-Transport-Kette entstehen, erzeugt. Werden diese Superoxid-Anionen-Radikale nicht durch die Mn-Superoxiddismutase unter Bildung von Wasserstoffperoxid gebunden, können sie mit dem in den Mitochondrien gebildeten NO die Entstehung des sehr reaktiven Peroxynitrits bedingen. Wir untersuchten deshalb, wie die Hemmung der NO Synthese durch L-NAME die aktive Atmung unter Hypoxie/Reoxygenierungsbedingungen und Ca-Ionen beeinflusst. Eine Wirkung von L-NAME wurde nur bei einer Konzentration von 0,2  $\mu\text{M}$  Ca-Ionen während Hypoxie/Reoxygenierung beobachtet. L-NAME schützte die Rattenlebermitochondrien gegen Abnahme ihrer aktiven Atmung (72 gegen 56 nmol  $\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ ). Bei einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  Ca-Ionen unter gleichen Bedingungen war keine Wirkung des L-NAME zu beobachten. Bei diesen Konzentrationen übernahm die Mn-Superoxidismutase und die Glutathionperoxidase den Schutz der aktiven Atmung der Rattenlebermitochondrien gegen Hypoxie und Reoxygenierung.

## 5. Diskussion

### ***5.1 Schädigung von isolierten Rattenlebermitochondrien durch Hypoxie / Reoxygenierung und extramitochondrialen Ca-Ionen***

Es konnte an *in-vivo*-Modellen von ischämischen und hämorrhagischen Leberinfarkten gezeigt werden, dass die mitochondrialen Funktionen in Hepatozyten geschädigt werden (39,40,41,42). Darüber hinaus haben Modifikationen von Enzymaktivitäten der antioxidativen Schutzenzyme in Knock-out-Mäusen deutlich gemacht, dass oxidativer Stress an der Gewebsschädigung beteiligt ist (43,44). Beides, das Auftreten von oxidativem Stress sowie die Einschränkung der mitochondrialen Funktionen, haben uns veranlasst, den konkreten Einfluss von Hypoxie, Reoxygenierung und erhöhten Ca-Ionen-Konzentrationen an isolierten Rattenlebermitochondrien zu untersuchen. In diesem Modell kann der Einfluss der Unterbrechung der Substratversorgung und der Sauerstoffversorgung detailliert untersucht werden. Im intakten System der Zelle oder gar des Organismus besteht wegen der hohen Komplexität nicht die Möglichkeit, den Effekt der einzelnen Faktoren getrennt zu untersuchen. Dies gilt besonders auch für den Effekt der zytosolischen Ca-Ionen-Konzentration.

Wir konnten eindeutig zeigen, dass allein ein Wechsel von Hypoxie und Reoxygenierung die mitochondriale Atmung schädigt und die Polarisierung der mitochondrialen Membran beeinträchtigt. Dabei ist das Ausmaß der Schädigung jeweils von der Dauer der Hypoxie und Reoxygenierung abhängig. Die Hauptschädigung erfolgt jedoch in der frühen Phase der Reoxygenierung. Erstmals konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass extramitochondriale Ca-Ionen einen wesentlichen Einfluss auf die Schädigung der mitochondrialen Funktionen nehmen. Entgegen Untersuchungen anderer

Arbeitsgruppen, die grundsätzlich eine Erhöhung der Schädigung durch die Erhöhung der Ca-Ionen-Konzentration beschreiben, konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Ca-Ionen-Konzentration auf ein optimales Maß von 2  $\mu\text{M}$  nicht schädigend, sondern protektiv wirkt.

Des Weiteren konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass die oxidative Modifizierung von Proteinen nach Hypoxie und Reoxygenierung ebenfalls Ca-Ionen-sensitiv ist. Das geringste Ausmaß der Proteinoxidation wurde wieder bei der optimalen Ca-Ionen-Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  beobachtet. Damit ist hochwahrscheinlich, dass die Konzentration von in den Mitochondrien gebildeten radikalen Sauerstoffspezies ( ROS ) eine Ca-Ionen-Abhängigkeit besitzt.

Es konnte gezeigt werden, dass Stickstoffmonoxid (NO) an der Einschränkung der mitochondrialen Funktion beteiligt ist (45,46). Erstmalig konnte nachgewiesen werden, dass unter Hypoxie und Reoxygenierung NO bei der funktionellen Schädigung eine Rolle spielt. Die Konzentration von dem in den Mitochondrien gebildeten NO steigt in der hypoxischen Phase dramatisch an. Mit Wiedereinfuhr von Sauerstoff in das System ist die Möglichkeit zur Bildung von Peroxidnitriten aus Superoxidanionenradikalen und NO gegeben. Es ist bekannt, dass sowohl NO durch Hemmung der Cytochromoxidase, als auch Peroxidnitrit durch Interaktion mit einzelnen Komplexen der Atmungskette die mitochondriale Atmung einschränken können (47,48,49). Dies erklärt den protektiven Effekt von L-NAME auf die Schädigung durch Hypoxie und Reoxygenierung.

Völlig neu ist auch die Erkenntnis, dass der Einfluss von NO auf die Schädigung der aktiven Atmung von Mitochondrien Ca-Ionen-sensitiv ist. Dabei wurde erstmals beobachtet, dass bei einer optimalen Ca-Ionen-Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  NO keine zusätzlichen Schäden verursacht.

Extramitochondriale Ca-Ionen, oxidativer Stress und NO sind bekannte Faktoren, die die Wahrscheinlichkeit des Öffnens der ‚Mitochondrial Permeability Transition Pore‘ (MPTP) erhöhen (50,51,52).

Tatsächlich wurde ein protektiver Effekt von Cyclosporin A hinsichtlich der Schädigung durch Hypoxie/Reoxygenierung und Ca-Ionen beobachtet. Bemerkenswert ist der im Rahmen der Arbeit erhobene Befund, dass auch bei

sehr geringen extramitochondrialen Ca-Ionen-Konzentrationen Cyclosporin A wirksam war. Dies ist verwunderlich, weil andere Autoren in ihren Arbeiten das Öffnen der MPTP erst bei erhöhten Ca-Ionen-Konzentrationen beschreiben (53,54).

Unsere Daten machen wahrscheinlich, dass die Erhöhung der extramitochondrialen Ca-Ionen-Konzentration auf etwa zu 2  $\mu\text{M}$  das Öffnen der Pore verhindert, da bei dieser Konzentration kein Effekt von Cyclosporin A auf die aktive Atmung der Rattenlebermitochondrien beobachtet wurde.

## ***5.2 Regulation der Mn-Superoxiddismutase und der Glutathionperoxidase durch Ca-Ionen und Hypoxie / Reoxygenierung***

Es konnte in einigen Laboratorien gezeigt werden, dass bei Ischämie und Reperfusion der oxidative Stress eine entscheidende Rolle spielt (43). Dies wurde eindrucksvoll in Tiermodellen bei Leberischämie demonstriert, in denen nachgewiesen wurde, dass eine Überexpression der Mn-SOD in Hepatozyten die Zellen vor dem Untergang schützt (55). Mitochondrien selbst sind hochproduktive Erzeuger von reaktiven Sauerstoffspezies ( Superoxidanionradikal, Wasserstoffperoxid, Hydroxyl-Radikal) (56,57).

Die eigenen Untersuchungen haben gezeigt, dass im Verlauf von Hypoxie / Reoxygenierung isolierte Rattenlebermitochondrien oxidativen Stress erzeugen, der anhand von Carbonylbildung ( Proteinoxidation ) dargestellt wird (Abbildung 6).

Erstmalig konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Ca-Ionen-Abhängigkeit der Proteinoxidation nach Hypoxie / Reoxygenierung demonstriert werden. Bei der protektiven Ca-Ionen-Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  ist die Proteinoxidation am geringsten. Darum kann man schlussfolgern, dass die Protektion auf einer Verminderung der Radikalprodukte beruht.

Interessanterweise korreliert darüber hinaus die funktionelle Schädigung mit dem Ausmaß der Proteinoxidation über den gesamten Ca-Ionen-Konzentrationsbereich. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass eine

Unterbindung des oxidativen Stress Grundlage für eine therapeutische Strategie sein könnte.

Die von uns erstmalig gefundene Ca-Ionen-Abhängigkeit der Proteinoxidation bei Hypoxie / Reoxygenierung motivierte uns, die aktuellen Aktivitäten der beiden Schutzenzyme, Mn-Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase, zu analysieren.

Beide antioxidativen Schutzenzyme wurden durch Hypoxie und Reoxygenierung bei Ca-Ionen-Konzentrationen größer als 1  $\mu\text{M}$  beträchtlich stimuliert. Die Erhöhung der Aktivitäten hat einen regulativen Charakter, da keine Änderungen in der Proteinmenge unter diesen Bedingungen gefunden wurden (Abbildung 11).

Eine Erhöhung der extramitochondrialen Ca-Ionen-Konzentration auf 2  $\mu\text{M}$  bewirkte zunächst eine Aktivitätssteigerung der Mn-SOD, nicht jedoch der GPx. Somit erklärt die Ca-Ionen-Sensitivität der Mn-SOD die Ca-Ionen-Abhängigkeit der Proteinoxidation nach Hypoxie und Reoxygenierung vollständig. Eine eindeutige Ca-Ionen-Abhängigkeit der GPx hingegen wurde nicht gefunden.

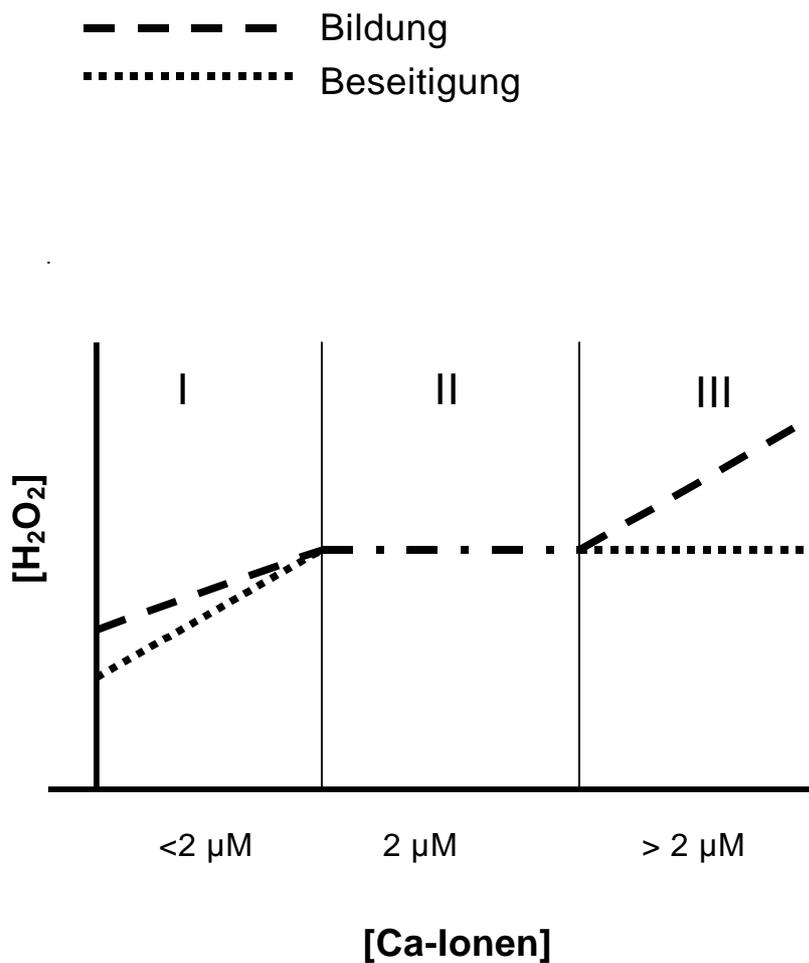
Neue Befunde haben erbracht, dass gerade die Regulation der Wasserstoffperoxidbelastung einen entscheidenden Einfluss auf das Schicksal von Zellen haben kann. Abhängig von der Wasserstoffperoxidkonzentration wird das weitere Schicksal der Zelle entweder durch Proliferation oder durch den Zelluntergang (Apoptose) determiniert (58). Die von uns gefundene Regulation der Glutathionperoxidase könnte somit über den unmittelbaren Effekt der Hypoxie / Reoxygenierung hinaus eine wichtige Rolle für die Regeneration geschädigter Gewebeanteile bilden .

Für eine bessere Regenerationsfähigkeit von Geweben sollte in Zukunft an Zellsystemen die Bedeutung der Ca-Ionen-Konzentrationen berücksichtigt und näher erforscht werden.

## 6. Schlussfolgerungen

Der oxidative Stress ist das Ergebnis von Radikalbildung und Radikalbeseitigung. Im Rahmen der Untersuchungen konnten Ca-Ionen-Konzentrationsbereiche festgelegt werden, in denen sich der oxidative Stress durch Hypoxie und Reoxygenierung unterscheidet (Abbildung 15):

- I* 0 – 1  $\mu\text{M}$  extramitochondriale Ca-Ionen: Die Bildung und Beseitigung von Radikalen steigt an, wobei die Bildungsrate größer ist als die Beseitigung (starke Carbonylbildung; hoher oxidativer Stress).
- II* 1 - 2  $\mu\text{M}$  extramitochondriale Ca-Ionen: Es besteht ein Gleichgewicht zwischen Bildung und Beseitigung von Radikalen (geringe Carbonylbildung; geringer oxidativer Stress).
- III* Über 2  $\mu\text{M}$  extramitochondriale Ca-Ionen: Die Aktivitäten der Schutzenzyme befinden sich auf einem hohen konstanten Niveau, jedoch steigt die Bildung der Radikale weiter an, welche im mitochondrialem Zusammenbruch endet (starke Carbonylbildung; hoher oxidativer Stress).



**Abbildung 15: Einfluss extramitochondrialer Ca-Ionen-Konzentrationen auf den oxidativen Stress durch Hypoxie/Reoxygenierung an isolierten Rattenlebermitochondrien:** Im Bild sind die hypothetischen Bildungs- ( - - - - - ) und Beseitigungsraten ( ..... ) von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 3 Konzentrationsbereichen (< 2 μM, 2 μM, >2μM) während der Hypoxie/Reoxygenierung schematisch dargestellt.

## 7. Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Ca-Ionen das Ausmaß des oxidativen Stresses regulieren. Dabei wurde eindeutig ein optimaler zytosolischer Konzentrationsbereich um 2  $\mu\text{M}$  gefunden, der hochprotektiv hinsichtlich der mitochondrialen Funktionen wirkt.

In der Behandlung von temporärer Ischämie an der Leber sollte dem Kalzium in Zukunft eine wichtigere Rolle zugesprochen werden. Eine denkbare Konsequenz der präsentierten Ergebnisse könnte zum Beispiel sein, dass in den Transportmedien von Lebertransplantaten Ca-Ionen in einer Konzentration enthalten sind, die im cytosolischen Bereich eine Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  einstellen. Zum anderen ist denkbar, dass bei einem zeitlich begrenztem Abklemmen von Leberarterien während Operationen an der Leber, dem Patienten zuvor Ca-Ionen substituiert wird, welches dann im entscheidenden Zeitraum zytosolisch für die protektive Aktivierung der Schutzenzyme zur Verfügung steht. Ein therapeutisches Einsatzgebiet des Kalziums könnte auch darin bestehen, Patienten, die einem erhöhten Risiko eines Multiinfarkts bei generalisierter Angiosklerose oder Thrombenbildung durch Vorhofflimmern unterliegen, Kalzium in dem Maß zu substituieren, dass es zytosolisch den protektiven Bereich einnimmt. Damit wird die Schädigung bei akut einsetzendem Verschluss mit möglicher anschließender Reperfusion minimiert.

Inwieweit sich der schützende Effekt von Ca-Ionen auf andere Organe ausbreiten lässt und wie man die exakte Einstellung der zytosolischen

Konzentration über die exogen zugeführten Ca-Ionen realisiert, sollten Gegenstände weiterführender Untersuchungen sein.

## 8. Zusammenfassung

Eine temporäre Ischämie der menschlichen Leber kann durch traumatische (Leberruptur), systemische (Leberinfarkt) oder iatrogene (Lebertransplantation) Ursachen entstehen. Ziel der medizinischen Behandlung besteht stets darin, das Organ schnellstmöglich in den Blutkreislauf einzubinden und damit zu reperfundieren.

Durch eine Vielzahl von Untersuchungen ist gesichert, dass Mitochondrien durch die Ischämie geschädigt und damit für die ischämische Leberschädigung Bedeutung haben. Die signifikante Zunahme der zytosolischen und der mitochondrialen Ca-Ionen-Konzentration ist ein besonderes Kennzeichen von Leberischämie-/ Reperfusion. Durch oxidativen Stress wird dann das Öffnen der ‚Mitochondrial-Permeability-Transition-Pore‘ verursacht. Durch die Erhöhung der mitochondrialen Permeabilität kommt es zur Freisetzung proapoptischer Faktoren, wie dem Cytochrom c, welche dann die Apoptose oder die Nekrose der Zelle hervorrufen. Cyclosporin A hemmt das Öffnen der Pore und schützt damit die Mitochondrien in der Phase der Reoxygenierung. Neuere Untersuchungen haben darüber hinaus gezeigt, dass bei der mitochondrialen Schädigung durch Ischämie/Reperfusion mitochondrial gebildetes Stickstoffmonoxid involviert ist.

Obwohl die Beteiligung von Ca-Ionen und Stickstoffmonoxid bei der ischämischen Leberschädigung demonstriert werden konnte, ist die Bedeutung der einzelnen Faktoren und ihr Zusammenspiel noch immer unklar. Die Beantwortung dieser Fragestellung ist aus methodischen Gründen weder am Gesamtorganismus noch auf zellulärer Ebene zufriedenstellend möglich.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden deshalb isolierte Rattenlebermitochondrien gewählt. In diesem Modell besteht die Möglichkeit, durch unabhängige Variationen mit extramitochondrialen Ca-Ionen, Stickstoffmonoxid, Hypoxie und Reoxygenierungszeiten, exakt deren

Einfluss auf die mitochondrialen Funktionen (Atmung, Membranpotential) zu untersuchen.

Dazu wurden isolierte Rattenlebermitochondrien einer transienten Hypoxie ausgesetzt und die Ca-Ionen-Konzentrationen im Inkubationsmedium variiert. Zur Charakterisierung der Mitochondrien in diesen pathophysiologischen Situationen wurden die Atmungsgeschwindigkeiten, die mitochondrialen Membranpotentiale, Stickstoff-Konzentrationen, Proteincarbonyle und die Aktivitäten der Mn-Superoxiddismutase und der Glutathionperoxidase quantifiziert.

Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die aktive Atmung und das mitochondriale Membranpotential durch steigende Hypoxie-/Reoxygenierungszeiten zunehmend geschädigt werden. Extramitochondriale Ca-Ionen-Konzentrationen über 3  $\mu\text{M}$  bedingen ebenfalls eine funktionelle Schädigung der Lebermitochondrien. Die Kombination von erhöhten Ca-Ionen-Konzentrationen und Hypoxie/Reoxygenierung verursachen den funktionellen Zusammenbruch der Organellen. Erstmals konnte gezeigt werden, dass in einem definierten Konzentrationsbereich zwischen 1  $\mu\text{M}$  und 2  $\mu\text{M}$  extramitochondriale Ca-Ionen eine protektive Wirkung bei Hypoxie/Reoxygenierung besitzen. Völlig neu ist dabei die Erkenntnis, dass die Protektion bei Hypoxie/Reoxygenierung in diesem Konzentrationsbereich auf der Aktivitätssteigerung der antioxidativen Schutzenzyme Mn-Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase beruht.

Es konnte zusätzlich demonstriert werden, dass oxidativer Stress, nachgewiesen durch die Bildung von Proteincarbonylen, maßgeblich an der Schädigung durch Hypoxie/Reoxygenierung beteiligt ist. Darüber hinaus wurden Nachweise der Beteiligung von Stickstoffmonoxid und dem Öffnen der ‚Mitochondrial-Permeability-Transition-Pore‘ an der Schädigung der Mitochondrien durch Hypoxie/Reoxygenierung außerhalb der protektiven Ca-Ionen-Konzentration erbracht. Neu ist auch die Erkenntnis, dass Cyclosporin A das Öffnen der ‚Mitochondrial-Permeability-Transition-Pore‘

oberhalb des protektiven Ca-Ionen-Bereichs (bis 4,5  $\mu\text{M}$ ) bei Hypoxie/Reoxygenierung verhindert.

Das wesentliche Ergebnis der Untersuchungen besteht in der Entdeckung eines protektiven Ca-Ionen-Bereiches. Diese Erkenntnis kann (muss) Einfluss auf die klinische Behandlung von temporären Leberischämien (geplante Eingriffe, Hochrisikopatienten) haben.

## 9. Literaturverzeichnis

1. Nunes G; Blaisdell FW; Margaretten W: Mechanism of hepatic dysfunction following shock and trauma. *Arch Surg* 100 546-56 (1970)
2. Grattagliano I, Vendemiale G, Lauterburg BH: Reperfusion injury of the liver: role of mitochondria and protection by glutathione ester. *J Surg Res* 86 2-8 (1999)
3. Isozaki H, Fujii K, Nomura E, Hara H :Calcium concentration in hepatocytes during liver ischaemia-reperfusion injury and the effects of diltiazem and citrate on perfused rat liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 12 291-7 (2000)
4. Leducq N, Delmas-Beauvieux MC, Bourdel-Marchasson I, Dufour S, Gallis JL, Canioni P, Diolez P : Mitochondrial and energetic dysfunctions of the liver during normothermic reperfusion: protective effect of cyclosporine and role of the mitochondrial permeability transition pore. *Transplant Proc* 32 479-80 (2000)
5. Leducq N, Delmas-Beauvieux MC, Bourdel-Marchasson I, Dufour S, Gallis JL, Canioni P, Diolez P : Mitochondrial permeability transition during hypothermic to normothermic reperfusion in rat liver demonstrated by the protective effect of cyclosporin A. *Biochem J* 336 501-6 (1998)
6. Soeda J, Miyagawa S, Sano K, Masumoto J, Taniguchi S, Kawasaki S : Cytochrome c release into cytosol with subsequent caspase activation during warm ischemia in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281 G1115-23 (2001)
7. Rivera-Chavez FA, Toledo-Pereyra LH, Dean RE, Crouch L, Ward PA: Exogenous and endogenous nitric oxide but not iNOS inhibition improves function and survival of ischemically injured livers. *J Invest Surg* 14 267-73 (2001)
8. J Morisue A, Wakabayashi G, Shimazu M, Tanabe M, Mukai M, Matsumoto K, Kawachi S, Yoshida M, Yamamoto S, Kitajima M :The role of nitric oxide after a short period of liver ischemia-reperfusion. *Surg Res* 109 101-9 (2003)

9. Meguro M, Katsuramaki T, Nagayama M, Kimura H, Isobe M, Kimura Y, Matsuno T, Nui A, Hirata K: A novel inhibitor of inducible nitric oxide synthase (ONO-1714) prevents critical warm ischemia-reperfusion injury in the pig liver. *Transplantation* 73 1439-46 (2002)
10. Ozakyol AH, Tuncel N, Saricam T, Uzuner K, Ak D, Gurer F : Effect of nitric oxide inhibition on rat liver ischemia reperfusion injury. *Pathophysiology* 7 183-188 (2000)
11. Shiva S, Brookes PS, Patel RP, Anderson PG, Darley-Usmar VM: Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 7212-7 (2001)
12. Schild L, Plumeyer F, Reinheckel T, Augustin W :Micromolar calcium prevents isolated rat liver mitochondria from anoxia-reoxygenation injury. *Biochem Mol Biol Int* 43 35-45 (1997)
13. Andreyev A, Fiskum G : Calcium induced release of mitochondrial cytochrome c by different mechanisms selective for brain versus liver. *Cell Death Differ* 6 825-32 (1999)
14. Petronilli V, Cola C, Bernardi P:Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. II. The minimal requirements for pore induction underscore a key role for transmembrane electrical potential, matrix pH, and matrix Ca-Ionen. *J Biol Chem* 268 1011-6 (1993)
15. Davies AM, Hershman S, Stabley GJ, Hoek JB, Peterson J, Cahill A: A Ca-Ionen-induced mitochondrial permeability transition causes complete release of rat liver endonuclease G activity from its exclusive location within the mitochondrial intermembrane space. Identification of a novel endo-exonuclease activity residing within the mitochondrial matrix. *Nucleic Acids Res* 31 1364-73 (2003)
16. Xue L, Borutaite V, Tolkovsky AM: Inhibition of mitochondrial permeability transition and release of cytochrome c by anti-apoptotic nucleoside analogues. *Biochem Pharmacol* 64 441-9 (2002)
17. Gogvadze V, Robertson JD, Zhivotovsky B, Orrenius S: Cytochrome c release occurs via Ca-Ionen-dependent and Ca-Ionen-independent mechanisms that are regulated by Bax. *J Biol Chem* 276 19066-71 (2001)
18. Kantrow SP, Piantadosi CA: Release of cytochrome c from liver mitochondria during permeability transition. *Biochem Biophys Res Commun* 232 669-71 (1997)

19. Wiswedel I, Trumper L, Schild L, Augustin W: Injury of mitochondrial respiration and membrane potential during iron/ascorbate-induced peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 934 80-6 (1988)
20. Schild L, Reinheckel T, Wiswedel I, Augustin W: Short-term impairment of energy production in isolated rat liver mitochondria by hypoxia/reoxygenation: involvement of oxidative protein modification. *Biochem J* 328 205-10 (1997)
21. Johnson D, Lardy HA : Isolation of liver or kidney mitochondria. *Methods Enzymol* 10 94-96 (1967)
22. McCormack JG, Denton RMJ: Influence of calcium ions on mammalian intramitochondrial dehydrogenases. *Methods Enzymol* 174 95-118 (1989)
23. Schild L; Schönfeld P (1986): Complexing of lipophilic cations and different anions as a possible cause of overestimating the transmembrane potential  $\Delta\psi$  as measured by ion-sensitive electrodes. *Biomedica biochimica acta*, 45 1215-25 (1986)
24. Kamo N, Muratsugu R, Honhoh R, and Kobatake J : *J Membr Biol* 49 105-121 (1979)
25. Reynafarje B, Costa LE, Lehninger ALJ: O<sub>2</sub> solubility in aqueous media determined by a kinetic method. *Anal Biochem* 145 406-418 (1985)
26. Fabiato A, Fabiato F: Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J Physiol (Paris)* 75 463-505 (1979)
27. Shacter E; Williams JA; Lim M; Levine RL: Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. *Free Radic Biol Med* 17 429-37 (1994)
28. Towbin H; Staehelin T; Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 76 4350-4 (1992)
29. Flohé L, Ötting F: Superoxidismutase assays. *Methods Enzymol* 105 93-104 (1984)
30. Paglia DE, Valentine WN: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70 158-169 (1967)
31. Gornall GA, Bardawill CJ, David MM: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177, 751-766 (1949)

32. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 248-254 (1976)
33. Schild I, Reinheckel T, Wiswedel I, Augustin W: Short-term impairment of energy production in isolated rat liver mitochondria by hypoxia/reoxygenation.involvement of oxidative protein modification. *Biochem. J.* 328, 205-210 (1997)
34. Lenaz G, Bovinac C, Formiggini G, Castella GP: Mitochondria, oxidative stress and antioxidant defenses. *Acta Biochim Pol*, 46:1-21 (1999)
35. Greene EL; Paller MS: Calcium and free radicals in hypoxia/reoxygenation injury of renal epithelial cells. *Am J Physic*, 266 13-20 (1994)
36. Shiraishi M; Kusano T; Hara J; Hiroyasu S; Miyaguni T; Muto Y: The effect of cyclosporin on endothelin levels after orthotopic liver transplantation in rats. *Transplant International*,10 207-211 (1997)
37. Durak I, Kacmaz M, Cimen MY, Buyukkocak S, Elgun S, Ozturk HS: The effects of cyclosporine on antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in rabbit hepatic tissues. *Transpl Immunol*, 10 255-8 (2002)
38. Bindoli A: Lipid peroxidation in mitochondria. *Free Radic Biol Med*.:5 247-61 (1988)
39. Levin GS, Tremasova Gla, Gubaev SA.: Mitochondrial oxidation in the liver during visceral-ischemic shock. *Vopr Med Khim.* 36 34-7 (1990)
40. Hirakawa A, Takeyama N, Nakatani T, Tanaka T.:Mitochondrial permeability transition and cytochrome c release in ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *J Surg Res*.;111(2):240-7 (2003)
41. Okatani Y, Wakatsuki A, Enzan H, Miyahara Y.: Edaravone protects against ischemia/reperfusion-induced oxidative damage to mitochondria in rat liver. *Eur J Pharmacol*.;465(1-2):163-70 (2003)
42. Elimadi A, Sapena R, Settaf A, Le Louet H, Tillement J, Morin D.: Attenuation of liver normothermic ischemia--reperfusion injury by preservation of mitochondrial functions with S-15176, a potent trimetazidine derivative. *Biochem Pharmacol*.; 62(4):509-16(2001)

43. Gonzalez-Flecha B, Cutrin JC, Boveris A: Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *J Clin Invest*;91(2):456-64. (1994)
44. Yabe Y, Kobayashi N, Nishihashi T, Takahashi R, Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M.: Prevention of neutrophil-mediated hepatic ischemia/reperfusion injury by superoxide dismutase and catalase derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* ;298(3):894-9 (2001)
45. Ghafourifar P, Bringold U, Klein SD, Richter C : Mitochondrial nitric oxide synthase, oxidative stress and apoptosis. *Biol Signals Recept.*(1-2):57-65 (2001)
46. Riobo NA, Clementi E, Melani M, Boveris A, Cadenas E, Moncada S, Poderoso JJ.: Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. *Biochem J* ;359(Pt 1):139-45 (2001)
47. Ghafourifar P, Schenk U, Klein SD, Richter C : Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *J Biol Chem* 274 31185-8 (1999)
48. Barone MC, Darley-Usmar VM, Brookes PS.: Reversible inhibition of cytochrome c oxidase by peroxynitrite proceeds through ascorbate-dependent generation of nitric oxide. *J Biol Chem.* 278 27520-4. (2003)
49. Boveris A, Costa LE, Poderoso JJ, Carreras MC, Cadenas E.: Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci*;899:121-35 (2000)
50. Horn TF, Wolf G, Duffy S, Weiss S, Keilhoff G, MacVicar BA: Nitric oxide promotes intracellular calcium release from mitochondria in striatal neurons. *FASEB J*;16(12):1611-22. (2002)
51. Schild L, Keilhoff G, Augustin W, Reiser G, Striggow F: Distinct Ca<sup>2+</sup> thresholds determine cytochrome c release or permeability transition pore opening in brain mitochondria. *FASEB J*;15(3):565-7 (2001)
52. Ichas F, Mazat JP : From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochim Biophys Acta* 1366 33-50 (1998)

53. Bernardi P, Petronilli V, Di Lisa F, Forte M. : A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem Sci.*;26(2):112-7 (2001)
54. Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F: Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* ;264(3):687-701 (1999)
55. Wheeler MD, Katuna M, Smutney OM, Froh M, Dikalova A, Mason RP, Samulski RJ, Thurman RG: Comparison of the effect of adenoviral delivery of three superoxide dismutase genes against hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hum Gene Ther.*;12(18):2167-77 (2001)
56. Young TA, Cunningham CC, Bailey SM: Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: studies using myxothiazol. *Arch Biochem Biophys*;405(1):65-72 (2002)
57. Venditti P, Costagliola IR, Di Meo S. : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and response to stress conditions by mitochondrial fractions from rat liver. *J Bioenerg Biomembr* ;34(2):115-25 (2002)
58. Bauer G.: Reactive oxygen and nitrogen species: efficient, selective, and interactive signals during intercellular induction of apoptosis. *Anticancer Res.*;20(6B):4115-39 (2000)



## 10. Danksagung

Ich danke von ganzem Herzen meinem Doktorvater Herrn Dr. rer. nat. habil. Lorenz Schild für seine Unterstützung, Motivation und Ausdauer in der Durchführung und Niederschrift dieser Arbeit. Er hat mich geführt, hat mich angeregt über Zusammenhänge selbst nachzudenken und hat mein Interesse für die komplexen molekularen Zusammenhänge in der Medizin geweckt.

Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. W. Augustin (früherer Direktor des Instituts für Pathologische Biochemie) für sein Interesse an meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Danken möchte ich auch den Doktoren I. Wiswedel, T. Reinheckel, den Medizinisch-Technischen-Assistenten Frau H. Goldhammer und Frau H. Faber und den Sekretärinnen Frau A. Stadler und Frau A. Schneider für die liebevolle Unterstützung.

Besonderer Dank gilt auch meiner Familie für die lange moralische Unterstützung.

## 10. Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

*„Einfluss von extramitochondrialen Ca-Ionen auf isolierte  
Rattenlebermitochondrien  
unter Hypoxie und Reoxygenierung“*

im Institut für Klinische Chemie und Pathologische Biochemie mit Unterstützung durch meinen Doktorvater Herrn Dr. rer. nat. habil. L. Schild und der Mitarbeiter des Instituts für Pathologische Biochemie ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe die Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht.

Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Gerwisch, den 01.10.2003

## 12. Beruflicher Werdegang

### **Persönliche Daten:**

*Name:* Plumeyer  
*Vorname:* Frank  
*geboren am:* 10.08.1970  
*in:* Burg

### **Schulbildung:**

1977-1987: Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule in Burg

1987-1989: Erweitere Oberschule mit Abitur in Burg

### **Berufsausbildung:**

1990-1992: pflegerische Hilfskraft im Kreiskrankenhaus Burg

1992-1999: Studium Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

1994: *Physikum*

1996: *1. Staatsexamen*

1998: *2. Staatsexamen*

1999: *3. Staatsexamen*

2000-2001: Arzt im Praktikum in der Chirurgischen Klinik des Ohrekreisklinikums Haldensleben

2001: Vollapprobation

seit 2001: Assistenzarzt in der Chirurgischen Klinik des Ohrekreisklinikums Haldensleben

*Qualifikationen: Fachkunde: „Arzt im Rettungswesen“,  
 Fachkunde: „Strahlenschutz“,  
 Fachkunde: „Sonographie“*

